



Instituto de Biomedicina de Sevilla  
Facultad de Medicina  
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

TESIS DOCTORAL

Hipertrofia del cuerpo carotídeo en hipoxia  
crónica: mecanismos de activación, proliferación y  
diferenciación de los progenitores neurales en el  
sistema nervioso periférico

Aida Platero Luengo  
Sevilla, 2014





Los Drs. Ricardo Pardal Redondo y José López Barneo, profesores numerarios del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

**CERTIFICAN QUE:**

La presente tesis doctoral titulada “Hipertrofia del cuerpo carotídeo en hipoxia crónica: mecanismos de activación, proliferación y diferenciación de los progenitores neurales en el sistema nervioso periférico”, presentada por la Licenciada en Biología Aida Platero Luengo, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biomedicina de Sevilla.

Sevilla a 20 de febrero de 2014.

Fdo. Dr. José López Barneo

Fdo. Dr. Ricardo Pardal Redondo





## Agradecimientos

En varias ocasiones durante estos años, me he sorprendido a mí misma soñando con el día de la presentación de la tesis doctoral, con tener este libro impreso entre las manos o pensando cómo escribiría los agradecimientos. Por muy lejano que parezca un momento, al final, siempre termina llegando. Así es la vida, todo llega y todo se acaba, pero al mismo tiempo comienzan nuevos propósitos.

Me alegro mucho de haber tomado la decisión de adentrarme en el mundo de la investigación al terminar la licenciatura de biología. He aprendido muchísimo en estos años sobre mí misma, mis habilidades, mis defectos, mis limitaciones y sobre lo que soy capaz de hacer, cómo afrontar nuevos retos y superarme. He aprendido también sobre las relaciones humanas, de poder, de amistad, sobre lo importante de aplicar el humor y la diversión a todo lo que uno hace. Lo que más me gusta de trabajar en ciencia es que siempre estás caminando hacia adelante, siempre estás en un continuo aprendizaje, lo que hace que cada día cuente.

Mis recuerdos están inundados de experiencias maravillosas y de algunos que otros sin sabores (no todo el monte es orégano). Pero me siento tremendamente agradecida por todo el apoyo y el cariño que he recibido de todos, en el laboratorio. El día ha llegado y aquí me encuentro frente al ordenador, escribiendo esta parte tan difícil y bonita de la tesis. Y como es de bien nacido ser agradecido.....aquí van algunas palabras:

Si empiezo por el principio, esta tarea no hubiese sido igual sin el amor y las enseñanzas de mi familia, a la que tanto admiro y de la que estoy tremendamente orgullosa. Mis primeras palabras de agradecimiento van para “mis progenitores favoritos”, mis padres. Gracias por vuestro apoyo, y por hacerme sentir tan querida. Mama, “Esperica” de mis amores, siempre me escuchas y me animas para que sea quien soy y para andar por la vida persiguiendo la felicidad, con la ilusión de empezar nuevos proyectos. Gracias por compartir conmigo tus experiencias. “Papa Fernan”, gracias por hacerme sentir tan especial, por confiar en mis habilidades, por hacerme esperar más de la vida. Me has inculcado el pensamiento crítico, el intentar ser consecuente y verdadero, y eso me ayuda cada día a enfrentarme con los nuevos retos. Y como no, a mi hermano, mi “Juanfruta”, que está ya hecho un hombre y al que quiero con locura. Gracias por ser tan paciente y bueno conmigo. Gracias por quererme. Los dos pilares de la familia, mis abuelos Juana y Paco. Gracias por todo vuestro cariño, por los “tapers”, los viajes y las mudanzas, por sentirnos siempre tan orgullosos de mí. Me habéis enseñado que, siempre, siempre, la vida merece la pena y hay que continuar aprendiendo y realizando sueños. A mi tía Mayte, a la que quería parecerme de pequeña, cuando andaba entre sus libros estudiando para sus exámenes de facultad. A Evita, gracias por tener tanta paciencia con los Plateros y por querernos.

Este trabajo ha sido posible gracias a Ricardo, mi director de tesis, que aceptó tenerme a su lado a pesar de haber yo confundido Alzheimer con Parkinson en nuestro primer encuentro (esto siempre me perseguirá, ;) ). Gracias por confiar en mí, por tener en cuenta mis opiniones y por enseñarme el valor de la constancia y el esfuerzo. Gracias a Pepe, mi otro director de tesis, por crear un ambiente científico de tanta calidad, del que todos hemos aprendido y al que todos hemos aportado nuestro granito de arena. Gracias por darme las armas con las que intentar llegar a ser una “científica de excelencia”.

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros del “Gran Mini-LIB” con los que empecé toda esta historia. Gracias a Rocío Duran por su pasión en el día a día y por acompañarme durante mis primeros pasos. Gracias a mi vecino de mesa José Antonio, por tratarme de tú a tú desde mis comienzos. Gracias a Antoñito, por enseñarme desinteresadamente y adentrarme en el mundo de la biología molecular. A Amel, a Alfonso, a Sonia, a Juanjo, a Villadiego, con el que puedo hablar de todo y que me cae tan bien, y a Nela, que me ha escuchado, animado, mimado y me ha dado su amistad. “Al Pacote”, gran compañero y amigo con el que hoy día puedo seguir contando. Y mi gran

descubrimiento, mi amiga Ana Belén, gracias por tu comprensión y tu cariño. Recuerdos también a los vecinos, a David Cano, por su ayuda con el IPA, a Ale por el apoyo, los cafés y las cervezas, y “al Selu” por todo lo que me acompañó en su momento.

Todas las personas que formaban parte del LIB y las nuevas adquisiciones que se integraron ya en el IBIS, han construido este magnífico entorno científico, y a todos ellos quiero felicitar por su esfuerzo, tesón y entusiasmo. A mis coetáneas Blanca y María. Gracias a PatriChica, por su ayuda con la qPCR y a Irene, gracias por Zurich. Piru y Pablo Mir, gracias por las risas y los bailes del comienzo. Konstantino, gracias por tu “gran sentido ruso del humor” y tu ayuda. Gracias Paula por las células GFP que me vinieron como agua de mayo. Gracias a mi amigo Ismael por ser como es y por acompañarme en mis locuras. Palabras de gratitud para PatriGrande y Vicki, compañeras de fatiga y neuroesferas cuya fuerza y vitalidad empujaron el proyecto en momentos difíciles. Gracias a Alberto Pascual, que siempre ha tenido tiempo y paciencia para discutir sobre mis experimentos. A Meriyou por su ayuda “citométrica”, por su amistad, y por recordarnos que el día menos pensado podemos ser campeones de España de algo. Y gracias a todos, todos los demás que de una forma u otra siempre habéis estado ahí para aconsejarme y ayudarme.

Y algunos años después del comienzo llegaron ellos, mis compañeros de grupo. Agradecerlos por haber hecho los últimos años más llevaderos y divertidos, por hacerme compañía y darme vuestro apoyo. Al Peri, por sus masajes fugaces, A Elenita, a Vero, por las charlas en La Piedra, a “Valentosa”, mi compi de baile, a Ismael “el guapetón”, el colofón que faltaba para darle a esto vidilla. También a los nuevos y a los que ya no están, Diana, Ana y ese “pedaso” de Roberto. Gracias también a Francisco Manuel Vega Moreno, el hombre más guapo del IBIS y conocido por todos como “El Paco”. Gracias por ser paciente, por tus continuas ayudas técnicas, por ser “cariñoso” y por quererme y aguantarme estos últimos meses.

También quiero dedicar unas palabritas a mis amigos de la facul a quienes quiero y con los que he vivido tantos buenos momentos. Gracias por seguir estando a mi lado. A Noe, a Paco, a Cris, al Cadi y al JCMaut. Gracias especiales a Edu, que me ha visto empezar y me verá terminar, me siento agradecida de seguir contando contigo. A mi amiga Rebeca, gracias por las risas y los llantos, las confidencias, las borracheras, lo compartido y lo que compartiremos, te quiero.

Y para terminar quiero dedicar unas palabras a todas las mujeres científicas que han quedado invisibilizadas durante la historia. Gracias por desafiar los tiempos y hacernos el camino más transitable a nosotras. Espero que las mujeres del presente luchemos también por seguir abriendo brechas.

*A las mujeres de mi vida,*

*A Esperanza y Fernando*

*A ti*



# ÍNDICE

---

ABSTRACT .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
1 El cuerpo carotídeo.....	3
1.1 Fisiología del cuerpo carotídeo .....	3
1.2 Desarrollo embrionario del cuerpo carotídeo .....	5
2 Células madre; aspectos generales.....	7
3 Células madre neurales adultas; concepto y metodología de estudio .....	11
3.1 Nichos neurogénicos en el sistema nervioso central.....	14
3.1.1 La zona subventricular.....	14
3.1.2 La zona subgranular .....	18
3.2 Neurogénesis en el sistema nervioso periférico; el cuerpo carotídeo .....	19
4 Regulación de la función de las células madre por los elementos del nicho y las condiciones ambientales .....	22
4.1 Hipoxia .....	23
4.2 Actividad neuronal.....	23
4.3 Endotelinas.....	25
OBJETIVOS .....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
1 Estudios in vivo .....	31
1.1 Animales.....	31
1.2 Administración de bromodesoxiuridina.....	31
1.3 Tratamiento de hipoxia crónica mediante cámaras isobáricas .....	32
1.4 Administración de fármacos .....	32
1.4.1 Bosentan.....	32
1.4.2 Cloruro de cadmio .....	33
1.4.3 Dimetiloxalilglicina .....	33
1.5 Técnicas histológicas .....	33
1.5.1 Perfusión intracardiaca .....	33
1.5.2 Inclusión de tejidos y corte.....	33
1.5.3 Preparación de tejidos frescos.....	34
1.6 Inmunofluorescencia en secciones de cuerpo carotídeo.....	34
1.7 Adquisición de imágenes .....	35
1.8 Cuantificaciones celulares y cuantificación del área de expresión .....	35
2 Estudios in vitro.....	35
2.1 Medios y soluciones .....	35
2.2 Disección y dispersión de tejidos .....	36

2.3	Cultivo de células madre del cuerpo carotídeo en condiciones de no adherencia: ensayo de neuroesferas .....	37
2.4	Técnicas inmunofluorescentes .....	37
2.4.1	Inmunofluorescencia en secciones de neuroesferas .....	37
2.4.2	Inmunofluorescencia de células dispersas de cuerpo carotídeo .....	38
2.5	Ensayos funcionales en cultivos de células madre del cuerpo carotídeo .....	38
2.5.1	Determinación de la capacidad proliferativa de las células madre del cuerpo carotídeo; medida del diámetro de las neuroesferas .....	38
2.5.2	Análisis de la diferenciación de las células madre del cuerpo carotídeo .....	39
3	Citometría de flujo .....	39
3.1	Separación de células de cuerpo carotídeo por <i>FACS</i> .....	39
3.2	Separación de células de neuroesferas por <i>FACS</i> .....	40
4	Análisis de expresión de ARN mensajeros .....	40
4.1	Extracción de ARN total y retrotranscripción .....	40
4.2	Reacciones de PCR .....	41
4.3	Transfecciones de células dispersas de cuerpo carotídeo con ARNi .....	42
5	Análisis de microarrays .....	42
5.1	Cultivos de neuroesferas para microarray .....	42
5.2	Estudio de expresión diferencial de genes .....	43
5.3	Validación de los microarrays.....	43
5.4	Estudio de las funciones biológicas mediante IPA .....	43
6	Análisis estadístico.....	44
7	Anexos .....	45
7.1	Anticuerpos utilizados.....	45
7.2	Secuencias y condiciones de cebadores utilizados.....	46
	RESULTADOS .....	47
1	Crecimiento del cuerpo carotídeo de rata en hipoxia crónica .....	47
2	Proliferación y diferenciación de las células madre del cuerpo carotídeo <i>in vitro</i> .....	49
3	Regulación de la proliferación y diferenciación de las células madre del cuerpo carotídeo <i>in vitro</i> .....	51
3.1	Efecto de los mitógenos sobre la neurogénesis de las células madre del cuerpo carotídeo.....	51
3.2	Efecto de la hipoxia sobre el cultivo de células madre del cuerpo carotídeo.....	53
3.3	Factores neurovasculares .....	55

4	Acción de la ET-1 sobre la proliferación y diferenciación <i>in vitro</i> de las células madre del cuerpo carotídeo .....	57
4.1	La ET-1 promueve la proliferación de las células madre del cuerpo carotídeo .....	57
4.2	La ET-1 frena la diferenciación dopaminérgica .....	61
5	Papel fisiológico de la ET-1 sobre el crecimiento del cuerpo carotídeo durante hipoxia crónica .....	62
6	Producción de ET-1 y presencia de sus receptores en el cuerpo carotídeo .....	64
6.1	Células productoras de ET-1 en el cuerpo carotídeo; células endoteliales y células glómicas .....	64
6.2	Expresión de los receptores de endotelina tipo A y tipo B .....	67
7	Papel de las células quimiosensoras en la proliferación del cuerpo carotídeo tras la exposición a hipoxia crónica .....	69
7.1	La estabilización de HIF no es el activador primario de la proliferación de las células madre del cuerpo carotídeo durante la exposición a hipoxia crónica .....	69
7.2	Estudio morfológico del nicho neurogénico del cuerpo carotídeo; sinapsis célula glómica-célula madre .....	71
7.3	Las células implicadas en la sinapsis son las primeras en activarse en hipoxia crónica .....	73
7.4	El bloqueo de la liberación de vesículas de las células glómicas frena la activación proliferativa en el cuerpo carotídeo.....	75
8	Vías moleculares implicadas en la proliferación y diferenciación de los progenitores del cuerpo carotídeo .....	78
8.1	Obtención de neuroesferas de cuerpo carotídeo enriquecidas en progenitores y neuroesferas enriquecidas en células neuronales.....	78
8.2	Expresión diferencial de genes entre progenitores y células neuronales del cuerpo carotídeo.....	79
8.3	Validación del estudio de microarrays.....	83
8.4	Huella genética de los progenitores y de las células neuronales del cuerpo carotídeo .....	84
8.5	Funciones biológicas representadas en los progenitores neurales y en las células neuronales del cuerpo carotídeo .....	86
8.6	Identificación de marcadores de membrana en progenitores neurales y en células neuronales .....	95
	DISCUSIÓN .....	101
1	El nicho del cuerpo carotídeo como modelo de neurogénesis.....	101
2	Regulación de la actividad de las células madre del cuerpo carotídeo por las células neuronales maduras. <i>La sinapsis quimio-proliferativa</i> .....	102
3	La ET-1 como transmisor en la <i>sinapsis quimio-proliferativa</i> .....	105
4	Papel de la sinapsis <i>quimi-proliferativa</i> en la aclimatación a la hipoxia crónica .....	107
5	Regulación del destino celular por factores del nicho del cuerpo carotídeo.....	107

6	Perfil genético de las células madre del cuerpo carotídeo .....	109
	CONCLUSIONS .....	115
	BIBLIOGRAFÍA.....	117
	ANEXO .....	135



# ABREVIATURAS

---

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>HEPES</b>	Ácido (2-(4-(2-hidroximetil)-1-piperacil)-etanosulfónico
<b>ADNc</b>	ADN complementario	<b>HIF</b>	Factor inducible por hipoxia
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>HSC</b>	Célula madre hematopoyética
<b>ARNi</b>	ARN de interferencia	<b>Hx</b>	Hipoxia
<b>ARNm</b>	ARN mensajero	<b>IgG</b>	inmunoglobulina G
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato	<b>IPA</b>	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro	<b>KO</b>	<i>knock out</i>
<b>BMP</b>	Proteína morfogénica del hueso	<b>MAPK</b>	Vía de las MAP quinasas
<b>BrdU</b>	5-bromo-2-desoxiuridina	<b>Min</b>	minutos
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino	<b>NCSC</b>	Célula madre derivada de la cresta neural
<b>CC</b>	Cuerpo carotídeo	<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>CMCC</b>	Célula madre del cuerpo carotídeo	<b>NS</b>	Neuroesfera
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono	<b>NSC</b>	Célula madre neural
<b>DAPI</b>	4,6-diamino-2-fenilindol dihidrocloruro	<b>NSdiff</b>	Neuroesferas diferenciadas
<b>DEMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco	<b>NSundiff</b>	Neuroesferas indiferenciadas
<b>DG</b>	Giro dentado	<b>Nx</b>	Normoxia
<b>DMOG</b>	dimetiloxalilglicina	<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótidos trifosfatos	<b>OCT</b>	criopreservante
<b>EFN</b>	Eficiencia de formación de neuroesferas	<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico	<b>PBTx</b>	PBS con tritón-X
<b>EPO</b>	eritropoyetina	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>ET-1</b>	Endotelina-1	<b>PEDF</b>	Factor derivado del epitelio pigmentario
<b>ET-RA</b>	Receptor de endotelina tipo A	<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>ET-RB</b>	Receptor de endotelina tipo B	<b>PHD</b>	Proil hidroxilasa
<b>FACS</b>	Separación de células activada por fluorescencia	<b>PO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de oxígeno
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino	<b>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativa
<b>FCH</b>	Fold change	<b>RT</b>	Temperatura ambiente
<b>FDR</b>	p-value ajustado por <i>false discovery rate</i>	<b>SC</b>	Célula madre
<b>FGF-2</b>	Factor de crecimiento fibroblástico 2	<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>FITC</b>	Fluoresceína	<b>SGZ</b>	Zona subgranular
<b>GABA</b>	Ácido gamma aminobutírico	<b>SMA</b>	actina de músculo liso
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar de la glía	<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde	<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
		<b>SVZ</b>	Zona subventricular
		<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa
		<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular



# FIGURAS Y TABLAS

---

Figura 1. Localización y organización del cuerpo carotídeo.....	4
Figura 2. Formación de la cresta neural.....	6
Figura 3. Componentes del nicho de células madre. ....	10
Figura 4. Tensiones de oxígeno en diferentes nichos de células madre.....	11
Figura 5. Principales centros neurogénicos en el cerebro adulto.....	12
Figura 6. Nicho neurogénico de la zona subventricular.....	15
Figura 7. Modelo tridimensional del nicho de la SVZ adulta.....	17
Figura 8. Nicho neurogénico de la zona subgranular. ....	18
Figura 10. Origen embrionario de las distintas células del CC.....	21
Figura 11. Glomérulo típico y linaje celular descrito a partir de la célula madre del cuerpo carotídeo. ....	22
Figura 12. Regulación de la neurogénesis por actividad neuronal en el hipocampo. ....	25
Figura 13. Esquema de la ruta de señalización activada por ET-1. ....	27
Figura 14. Cámara de hipoxia para animales.....	32
Figura 15. Cuantificación del volumen y el número de células del cuerpo carotídeo de ratas expuestas a hipoxia.....	47
Figura 16. Cambios del parénquima vascular del cuerpo carotídeo durante la exposición a hipoxia crónica.....	48
Figura 17. Neuroesferas de cuerpo carotídeo. ....	50
Figura 18. Efecto de los mitógenos en neuroesferas de cuerpo carotídeo. ....	52
Figura 19. Efecto de la hipoxia sobre la proliferación y diferenciación de las células madre del cuerpo carotídeo.....	54
Figura 20. Tamaño de las neuroesferas de cuerpo carotídeo cultivadas con diferentes factores neurovasculares.....	56
Figura 21. Efecto de la ET-1 sobre el cultivo de neuroesferas de cuerpo carotídeo. ....	58
Figura 22. Inhibición de la expresión de los receptores de ET-1 mediante ARNi. ....	59
Figura 23. Efecto de la ET-1 sobre los progenitores neurales del cuerpo carotídeo. ....	60
Figura 24. Efecto de la ET-1 sobre la diferenciación de los progenitores neurales del cuerpo carotídeo.....	61
Figura 25. Implicación de ET-1 en la hipertrofia ocurrida en el cuerpo carotídeo en hipoxia crónica. ....	63
Figura 26. Expresión de ET-1 en las células glómicas del cuerpo carotídeo. ....	65
Figura 27. Esquema del tratamiento hipóxico recibido por los cultivos de células dispersas de cuerpo carotídeo. ....	66

Figura 28. Expresión de los receptores de ET-1 en el cuerpo carotídeo.....	68
Figura 29. Participación de la estabilización de HIF en el crecimiento del cuerpo carotídeo.....	70
Figura 30. Contactos “sinápticos” entre las células neuronales tipo I y las células gliales tipo II en el parénquima del cuerpo carotídeo. ....	72
Figura 31. Dinámica proliferativa de las distintas poblaciones celulares del cuerpo carotídeo durante la exposición a hipoxia. ....	74
Figura 32. Inhibición farmacológica de la liberación de vesículas. ....	75
Figura 33. Alteración genética de la función de las células tipo I. ....	77
Figura 34. Caracterización de las poblaciones NSdiff y NSundiff.....	80
Figura 35. Controles de calidad del estudio de microarrays. ....	81
Figura 36. Niveles de expresión de genes seleccionados para la validación por qRT-PCR.....	83
Figura 37. Categorías destacadas en NSundiff.....	87
Figura 38. Categorías destacadas en NSdiff.....	88
Figura 40. Resumen gráfico que ilustra la hipótesis de la sinapsis quimi-proliferativa en el CC.....	105
Figura 41. Tipos celulares derivados de la cresta neural de vertebrados.....	111
Figura 42. Modelo de la segregación de linajes celulares derivados de la cresta neural cefálica. ....	112
Tabla 1. Consideraciones críticas para ensayos de formación de esferas.....	14
Tabla 2. Anticuerpos primarios.....	45
Tabla 3. Anticuerpos secundarios. ....	45
Tabla 4. Cebadores para PCR. ....	46
Tabla 5. Factores estudiados en cultivos de neuroesferas de cuerpo carotídeo..	55
Tabla 6. Expresión de los receptores de ET-1 en las células del cuerpo carotídeo. ....	67
Tabla 7. Perfil de identidad de las NSdiff y de las NSundiff.....	82
Tabla 8. Expresiones de genes seleccionados para validación por qRT-PCR.....	84
Tabla 9. Huella genética de los progenitores y las células neuronales del CC.....	85
Tabla 10. Biofunciones destacadas en las células progenitoras del CC. ....	89
Tabla 11. Biofunciones destacadas en las células neuronales del CC.....	92
Tabla 12. Las cinco Biofunciones más destacadas en NSundiff y NSdiff.....	95
Tabla 13. Rutas de señalización canónicas destacadas en NSundiff.....	96
Tabla 14. Rutas de señalización canónicas destacadas en NSdiff.....	96
Tabla 15. Proteínas de membranas más expresadas en NSundiff.....	99
Tabla 16. Proteínas de membrana más expresadas en NSdiff. ....	100

# ABSTRACT

---

The goal of this doctoral thesis is to achieve a better understanding of the biology and behavior of the recently discovered adult carotid body neural stem cells. The work focuses on two main objectives. First, to study from a physiological and cellular standpoint, the mechanisms involved in the activation of carotid body neural stem cells; and secondly, to unravel the genes and molecular pathways involved in stemness, maintenance and differentiation of these cells.

## **An O<sub>2</sub>-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia**

Adult stem cells reside within specific “niches” which provide the appropriate environment to maintain their ability for self-renewal and multipotency. These cells are normally in a dormant state that protects them from stressors; the manner by which they are selectively activated to progress from quiescence to differentiated mature cells is still to be resolved (Suda et al., 2011; Chell and Frisen, 2012). Neural stem cells (NSC), which resemble embryonic radial glia-like cells, and are able to generate new neurons and glial cells, persist in two niches in the adult mammalian central nervous system: the subventricular zone (SVZ) and the subgranular layer of the hippocampus (SGZ) (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Zhao et al., 2008). Central neurogenesis is crucial for numerous brain functions and its impairment could be involved in some neuropsychiatric disorders (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Ming and Song). NSC can sense neuronal activity, as a result of which adult neurogenesis is modulated by experience and environmental stimuli. However, the coupling of lineage progression to physiological demand remains poorly understood (Hoglinger et al., 2004; Liu et al., 2005; Ge et al., 2006; Song et al., 2012).

Multipotent NSC of glial lineage also exist in the adult carotid body (CB), a neural crest-derived paired organ located in the carotid bifurcation (Pardal et al., 2007). The CB is composed of clusters (glomeruli) of neuron-like glomus (type I) cells that are electrically excitable and have numerous secretory vesicles containing neurotransmitters and neuropeptides. Glomus cells are surrounded by processes of glia-like sustentacular (type II) cells. This organ is the main arterial chemoreceptor that mediates reflex hyperventilation during hypoxemia. Glomus cells, the primary O<sub>2</sub>-sensing elements in the CB, depolarize in response to hypoxia, thereby releasing neurotransmitters that activate sensory nerve fibers terminating in the brainstem respiratory center (Lopez-Barneo et al., 2001). In addition to this fundamental role in acute oxygen sensing, the CB exhibits a remarkable structural plasticity that is uncommon for a neural tissue, which is manifested upon chronic exposure to hypoxia. The CB grows to several times its normal size during acclimatization in high altitude dwellers (Arias-Stella and Valcarcel, 1976) or in hypoxemic patients suffering cardiopulmonary disorders (Heath et al., 1982). We have shown that the glia-like type II cells, selectively expressing glial fibrillary acidic protein (GFAP), are NSC and contribute to CB growth in hypoxia. These cells form clonal colonies in vitro that are enriched in proliferating Nestin-positive(+) progenitors that give rise to mature glomus cells and other neural crest cell lineages. Similarly, cell fate experiments in vivo have demonstrated that NSC contribute to the generation of new glomus cells in animals exposed to sustained hypoxia (Pardal et al., 2007).

Stem cells in the CB neurogenic center are quiescent under normoxic conditions. Nonetheless, they become activated upon lowering blood O<sub>2</sub> tension (hypoxia), a well-defined and controllable variable. Therefore, the CB niche provides an ideal model in which to study activity-dependent neurogenesis and to explore the mechanisms whereby stem cells switch from dormancy to cycling. Herein we show that, unexpectedly, CB NSC proliferation *in vitro* is insensitive to hypoxia over a broad range of O<sub>2</sub> tensions. We provide compelling structural and functional evidence supporting the existence of abundant direct “synaptic” contacts between mature neuron-like, O<sub>2</sub>-sensitive, glomus cells and glia-like progenitors, thus optimizing the activity-dependent stimulation of stem cells. The release of stored neurotransmitters from glomus cells during hypoxia induces the proliferation of progenitor cells and growth of the CB. Among the substances released by glomus cells we have identified endothelin-1 (ET-1), an agent involved in neural crest progenitor specification and migration (Shin et al., 1999; Bonano et al., 2008), as a powerful activator of CB stem cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. In this way, O<sub>2</sub>-sensing glomus cells mediate both the acute activation of the respiratory center and the chronic induction of CB growth upon exposure to hypoxia.

### Gene expression profile in adult carotid body stem cells

The molecular mechanisms underlying CB stem cell proliferation and differentiation are poorly known. We have set up conditions *in vitro* to enrich neurosphere cultures in undifferentiated (NSundiff) or differentiated (NSdiff) cells. We performed gene expression studies by microarray techniques to identify molecules and pathways involved in the biology of CB progenitor cells. Microarray results were validated by PCR analyses of individual molecules, thus confirming that proliferation genes and markers of stemness and undifferentiated state are mainly expressed in the NSundiff sample, whereas neuronal genes are highly expressed in differentiated cultures. The analysis *in silico* performed by IPA software shows that CB stem cells conserve the ability to give rise to several neural crest derivatives. The results confirm that multipotent CB progenitors are neural crest-derived stem cells that persist in the adult organ. CB stem cells cannot be prospectively isolated due to the lack of selective membrane markers suitable for cell sorting. We have identified CD10, a membrane metalloendopeptidase, as the most highly expressed surface marker in NSundiff. CD10 has allowed the sorting of a purified CB progenitor population, which is being currently studied and characterized in our laboratory.

In summary, this study increases our knowledge on the molecular and cellular properties of CB stem cells, the only neurogenic niche known so far in the adult peripheral nervous system. Our results could be relevant for the understanding of hypoxia-associated pathologies, and for the use of CB stem cells in cell therapy against neurodegenerative disorders.



# INTRODUCCIÓN

---

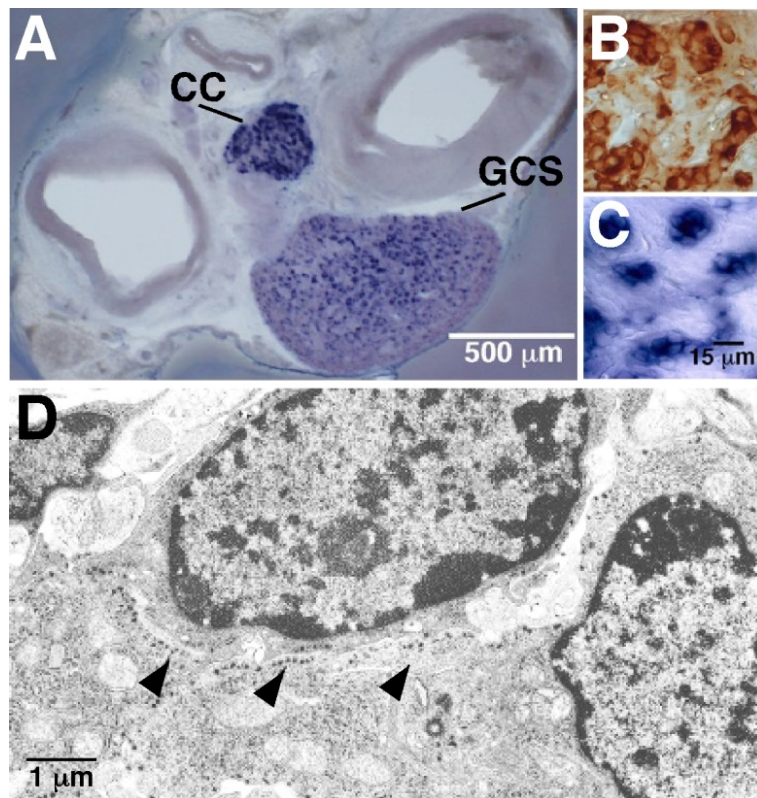
## 1 El cuerpo carotídeo

### 1.1 Fisiología del cuerpo carotídeo

El cuerpo carotídeo (CC) es un pequeño órgano quimiorreceptor que forma parte del sistema nervioso periférico (SNP) y está situado en la bifurcación de la arteria carótida (Figura 1). Su principal función es la detección de la presión parcial de oxígeno (PO<sub>2</sub>) en sangre, aunque actúa como un receptor polimodal, siendo además sensible a los cambios en la concentración de CO<sub>2</sub>, protones (pH) y glucosa (Fitzgerald RS, 1986; Lopez-Barneo et al., 2001; Lopez-Barneo, 2003). El CC tiene un papel fundamental en la respuesta aguda hiperventilatoria a la hipoxemia (Teppema and Dahan, 2010), y alteraciones en su función o estructura están implicadas en varias enfermedades humanas (Lopez-Barneo et al., 2008).

El CC se encuentra entre los órganos más irrigados del organismo (Fidone, 1986), recibiendo una gran aportación de sangre a través de una rama de la arteria carótida externa. Existe una profusa red de pequeños capilares que se entretajan a través de todo el parénquima del CC. Este quimiorreceptor está además altamente innervado por fibras sensoriales aferentes y por fibras eferentes del sistema nervioso autónomo. La innervación principal es a través del nervio del seno carotídeo, rama del nervio glosofaríngeo (novenio par craneal), que contiene fibras procedentes principalmente de neuronas sensoriales primarias localizadas en el ganglio petroso. Aparte de la innervación sensorial, el CC recibe innervación eferente parasimpática y simpática, esta última a partir de pequeños nervios ganglio-glomerulares procedentes del vecino ganglio cervical superior (Fidone, 1986).

El CC es un órgano de forma redondeada donde sus células se disponen formando glomérulos. Estos glomérulos están compuestos principalmente por células neuronales quimiosensoras llamadas células glómicas o tipo I, y en menor número por células de sostén, llamadas células sustentaculares o tipo II. Las células glómicas son células más o menos esféricas de 10-12 µm de diámetro, que se caracterizan por tener numerosas vesículas secretoras cargadas de dopamina y otros neurotransmisores (ATP, acetilcolina), además de varios péptidos moduladores (sustancia P, encefalinas, ET-1) (Smith et al., 1990). Al ser altamente dopaminérgicas las células glómicas tienen una expresión elevada del marcador tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. Las células glómicas también producen grandes cantidades del factor trófico GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), involucrado en el efecto protector y regenerador del CC en la terapia celular anti-parquinsoniana (Villadiego et al., 2005). Las células sustentaculares son de menor tamaño y de forma alargada, con extensos procesos citoplasmáticos que envuelven a las células neuronales. Estas células se caracterizan por la expresión de marcadores de tipo glial como las proteínas GFAP (glial fibrillary acidic protein) y S100. Además de estos dos tipos celulares, en el CC se pueden encontrar células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y un pequeño número de neuronas parasimpáticas localizadas interglomerularmente, cuyos axones inervan a capilares y arteriolas (Fidone, 1986).



**Figura 1. Localización y organización del cuerpo carotídeo.** **A** Sección de la bifurcación de la arteria carótida, tras hibridación *in situ* para TH, mostrándose la localización del CC en el centro de la bifurcación, muy cercano al ganglio cervical superior (GCS). **B** y **C** Organización del CC en glomérulos. La elevada expresión en los glomérulos del marcador dopaminérgico TH se muestra por inmunohistoquímica (B) e hibridación *in situ* (C). **D** Análisis ultraestructural del CC, mostrándose dos células glómicas, identificables por los núcleos con la cromatina condensada así como por la presencia en el citoplasma de numerosas vesículas de núcleo denso (señaladas por puntas de flecha). Imágenes en A, B y C modificadas de (Toledo-Aral et al., 2002); imagen en D modificada de Kameda, 2005.

La principal característica funcional del CC es su sensibilidad a los cambios en la tensión de  $O_2$  del medio. La disminución de la tensión de  $O_2$  sanguíneo (hipoxemia) es detectada por las células glómicas, que son excitables y contienen un amplio espectro de canales voltaje y ligando dependientes (Duchen et al., 1988; Lopez-Barneo et al., 1988). La disminución en la  $PO_2$  provoca el cierre de canales de  $K^+$  con la consecuente reducción de la conductancia a este ión, desencadenándose así la despolarización celular (Lopez-Barneo et al., 1988; Peers and Green, 1991; Stea and Nurse, 1991; Buckler and Vaughan-Jones, 1998). Como resultado de esta despolarización, se abren canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes, facilitándose la entrada de este calcio y activándose la secreción de neurotransmisores por exocitosis (Urena et al., 1994). La liberación de neurotransmisores al espacio sináptico activa a las fibras sensoriales aferentes que dispararán la respuesta hiperventilatoria en el SNC para restaurar los niveles de  $O_2$  en el organismo (Urena et al., 1994; Peers and Buckler, 1995; Montoro et al., 1996). Las células glómicas también se despolarizan en respuesta a una reducción de la glucosa extracelular (Pardal and Lopez-Barneo, 2002; Garcia-Fernandez et al., 2007; Zhang et al., 2007; Fitzgerald et al., 2009), aunque el papel del CC como regulador de la glucemia en sangre está sujeto actualmente a debate (Bin-Jaliah et al., 2004; Ward et al., 2009; Wehrwein et al., 2010; Ortega-Saenz et al., 2013).



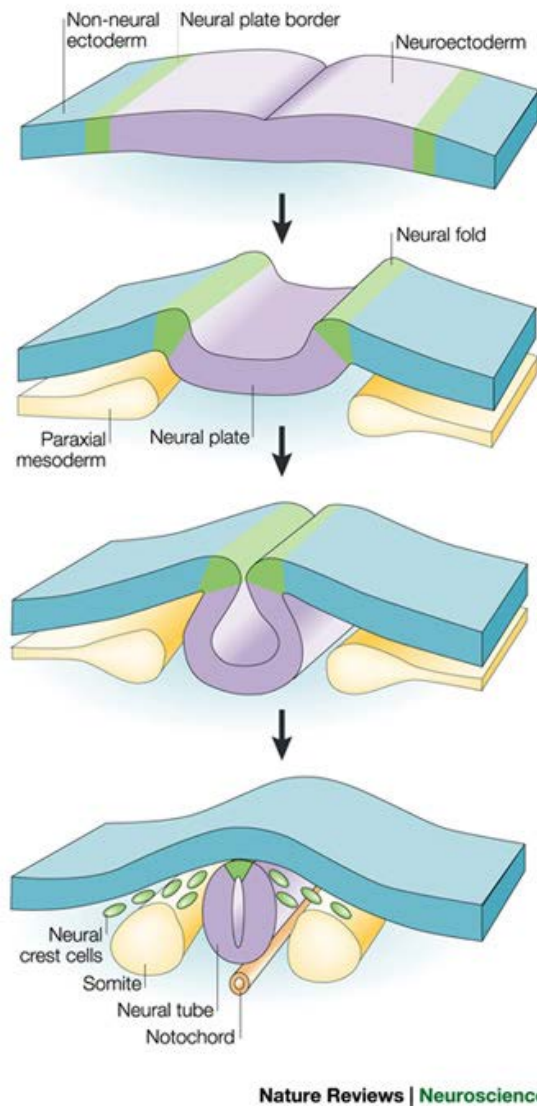
Además de la respuesta del CC a la hipoxia aguda, cuando la condición de hipoxemia es mantenida en el tiempo, se desencadenan dentro del órgano numerosos cambios moleculares, neuroquímicos y anatómicos (Bisgard, 2000; Wang and Bisgard, 2005), siendo el más significativo un aumento considerable en el tamaño. Este cambio morfológico, que incrementa los impulsos excitatorios que recibe el centro respiratorio, constituye una respuesta homeostática fundamental que permite la aclimatación de los humanos y otros mamíferos a la altitud, y ayuda a la supervivencia de los pacientes con enfermedades cardiorrespiratorias asociadas a hipoxemia (Edwards et al., 1970; Lopez-Barneo et al., 2001; Weir et al., 2005). La hipertrofia del CC en condiciones de hipoxia incluye un aumento de la vascularización y del tamaño del parénquima neurosecretor (Arias-Stella and Valcarcel, 1976; McGregor et al., 1984). La vascularización, que se debe a vasodilatación y a la aparición de nuevos vasos, se atribuye a la sobre-expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) (Chen et al., 2003). El incremento en el parénquima dopaminérgico se debe a la hipertrofia e hiperplasia de las células glómicas (McGregor et al., 1984). Aunque algunas células glómicas (tipo I) tienen la capacidad de sufrir mitosis (Chen et al., 2007b; Pardal et al., 2007; Wang et al., 2008), existe en el CC una población de progenitores (CMCC, “células madre del cuerpo carotídeo”) capaces de activarse en hipoxia, proliferar, y diferenciarse hacia nuevas células glómicas. Estos progenitores son las células sustentaculares (tipo II), a las que clásicamente se les atribuía una función meramente de sostén (Pardal et al., 2007). Las células tipo II presentan un fenotipo glial y comparten características con las células madre de los nichos neurogénicos del sistema nervioso central (SNC), es decir, la zona subventricular (SVZ, *subventricular zone*) de los ventrículos laterales y el giro dentado (DG, *dentate gyrus*) en el hipocampo. El CC representa por tanto un importante nicho neurogénico en el sistema nervioso periférico (SNP) adulto. El objetivo principal del presente trabajo de tesis doctoral es continuar con la caracterización del nicho neurogénico del CC, y aclarar los mecanismos moleculares y celulares implicados en la activación proliferativa de las CMCC durante la hipoxia.

## 1.2 Desarrollo embrionario del cuerpo carotídeo

El CC y otras estructuras quimiosensoras relacionadas constituyen una de las muchas especializaciones evolutivas de la región cefálica que permitió la adaptación de los primeros vertebrados a la vida como predadores activos, ya que facilita la adaptación rápida de los organismos a situaciones intensas de estrés. El CC como tal está presente en aves y mamíferos, aunque existen estructuras afines más primitivas en vertebrados inferiores, que comparten origen y función similares.

Las células del CC derivan embriológicamente de la cresta neural (Milsom and Burleson, 2007). Los primeros trabajos desarrollados para caracterizar la migración y destino de las células de la cresta neural se llevaron a cabo utilizando quimeras de codorniz y pollo, que constituyeron el primer sistema estable para el seguimiento de estas células en embriones (Pearse et al., 1973; Le Lievre and Le Douarin, 1975; Le Douarin, 1980, 1986a). En mamíferos se obtuvo una información equivalente mediante el uso de ratones transgénicos con genes reporteros bajo el control del promotor Wnt1 (un proto-oncogen expresado por células de la cresta neural). Esta técnica de trazado de linaje celular en mamíferos ha permitido confirmar que tanto las células glómicas como las células sustentaculares (tipo II) tienen su origen en la cresta neural (Pardal et al., 2007).

La cresta neural es una estructura embrionaria transitoria característica de los vertebrados que deriva del ectodermo. Se localiza en los márgenes del primordio neural, formando un área intermedia entre el epitelio neural y la epidermis. La cresta neural está compuesta por una población de células embrionarias multipotentes que se delaminan antes del cierre del tubo neural durante la neurulación (Le Douarin, 1986a; Dupin and Sommer, 2012) (Figura 2).



**Figura 2. Formación de la cresta neural.** La cresta neural aparece en el borde de la placa neural. Tras el cierre del tubo neural, se delamina desde la región entre el tubo neural dorsal y el ectodermo suprayacente, y migra hacia la periferia. Adaptado de Gammill y Bronner-Fraser, 2003.

Las células de la cresta neural migran durante la embriogénesis, en función de su posición, a lo largo del borde de la placa neural para colonizar otros tejidos donde se diferencian a diversos tipos celulares. Estas células dan lugar a un gran número de estructuras, que incluyen el esqueleto craneofacial, la mandíbula, los melanocitos de la piel, células musculares lisas de las arterias del arco branquial y sus derivados, y la mayoría del SNP, incluyendo los ganglios autonómicos como el

ganglio cervical superior, ganglios entéricos, ganglios de la raíz dorsal, las células de Schwann, células cromafines de la médula adrenal, y algunos órganos sensoriales especializados como el CC (Dupin and Sommer, 2012). La cresta neural se estructura en diferentes regiones: craneal, troncal, vagal y sacral. Cada región da lugar a diferentes poblaciones celulares y estructuras corporales, siendo las células de la región craneal las que forman el CC.

El primer signo morfológico del CC de mamíferos durante el desarrollo embrionario lo constituye una acumulación de células mesenquimales en la pared de la tercera arteria branquial (Kondo, 1975), que recibe el nombre de *primordio del CC*, donde presumiblemente se encuentran las células sustentanculares (Kameda, 2005; Hempleman and Warburton, 2013). Las paredes de las arterias de los arcos branquiales o faríngeos, incluida la tercera arteria branquial, derivan de células mesenquimales de la cresta neural (Jiang et al., 2000). El primordio del CC es colonizado por células precursoras neurales procedentes del vecino ganglio cervical superior, que irán migrando y diferenciándose hasta convertirse en las células glómicas del CC (Le Douarin et al., 1972; Kameda et al., 1994; Kameda, 2002; Kameda et al., 2002). El primordio es invadido durante todo el proceso por fibras procedentes del ganglio cervical superior y del nervio glosofaríngeo.

Varios estudios con ratones transgénicos sugieren que el CC está formado por células procedentes de dos linajes de la cresta neural (Pardal et al., 2007; Kameda et al., 2012): células mesenquimales de la cresta neural procedentes de la tercera arteria branquial (Le Lievre and Le Douarin, 1975; Waldo et al., 1999; Jiang et al., 2000), y células neurales derivadas del ganglio vecino, provenientes también de la cresta neural (Le Douarin et al., 1972; Le Douarin, 1986b). Como se discute más adelante, este doble ambiente neural y mesenquimal podría influir en la especificación y multipotencia de los progenitores del órgano.

## 2 Células madre; aspectos generales

El término célula madre se refiere a una célula que cumple dos características principales. Es una célula indiferenciada capaz de proliferar para auto-renovarse y, además, en respuesta a los estímulos adecuados, es capaz de diferenciarse hacia otros tipos celulares específicos de tejidos u órganos, para cumplir funciones especializadas (Potten and Loeffler, 1990; Morrison et al., 1997).

Las células madre pueden tener diferente potencial de diferenciación según su origen. Se considera *célula totipotente* a aquella que puede generar cualquier tipo celular de cualquier tejido del organismo, incluyendo el tejido extra-embionario, de manera que esta célula podría originar un individuo completo. Las células totipotentes sólo se encuentran en el cigoto. Una *célula pluripotente* es aquella que puede dar lugar a células de más de una capa germinal (endodermo, mesodermo y ectodermo) pero no al trofoblasto (capa externa del blastocisto) (Thomson et al., 1998; Chambers and Smith, 2004), es decir, no a los tejidos extra-embionarios. Estas células forman parte de la masa celular interna del blastocisto y se denominan *células madre embrionarias*. Por último y con potencial de diferenciación más restringido, encontramos las *células multipotentes*, que pueden diferenciarse a varios o todos los tipos celulares sólo del tejido al que pertenecen (Weissman, 2000b, a; Fuchs et al., 2004). Estas células se denominan también *células madre somáticas*, *células madre tejido-específicas* o *células madre adultas* y pueden ser más o menos restringidas y tener más o menos capacidad de auto-renovación. También se usa el término general *progenitor* que puede referirse a las

células madre adultas o a las células que derivan directamente de estas, las cuales poseen una capacidad de autorrenovación y diferenciación más restringida y están especificadas hacia un linaje concreto.

Las investigaciones con células madre adultas han generado gran expectación desde que comenzaron los primeros estudios, en los años 50, con células madre hematopoyéticas de la médula ósea (Till and Mc, 1961). Se han identificado células madre adultas en muchos órganos y tejidos incluyendo médula ósea (Spangrude et al., 1988; Jiang et al., 2002; Gronthos et al., 2003), sistema nervioso central y periférico (Morrison et al., 1999; Gage, 2000; Temple, 2001; Kruger et al., 2002), sangre (Jiang et al., 2002), vasos sanguíneos, músculo esquelético, piel (Toma et al., 2001), dientes, corazón (Beltrami et al., 2003), epitelio intestinal (Loeffler et al., 1993), hígado, ovario, testículo y retina (Stemple and Anderson, 1992; Weissman, 2000a; Okano, 2002). Debido a su persistencia en los tejidos adultos, las células madre tejido-específicas se han convertido en un modelo muy interesante para su utilización en terapia celular y medicina regenerativa. Su función principal es participar en la homeostasis del tejido, manteniendo y renovando las estructuras dañadas o envejecidas. Estas células establecen un balance muy delicado entre la auto-renovación y la diferenciación, para hacer frente a la demanda tisular y para mantener constante su presencia en el tejido, convirtiéndose, al menos en algunos sistemas como el hematopoyético, en un reservorio celular durante toda la vida del individuo.

Las células madre hematopoyéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*) son las más conocidas y mejor caracterizadas desde su descubrimiento en 1945 (Till and Mc, 1961; Becker et al., 1963), y actualmente son las únicas células madre usadas rutinariamente en terapia celular para el tratamiento de leucemias y enfermedades autoinmunes. Estas células son las responsables de formar todos los tipos celulares de la sangre y están encargadas de reemplazar diariamente millones de células durante toda la vida del individuo. En la vida adulta, las HSC se encuentran fundamentalmente en la médula ósea, aunque pueden detectarse también en sangre periférica, bazo e hígado. El conocimiento generado por el estudio de las HSC ha sido fundamental para la caracterización de otras poblaciones de células madre adultas, cuya aplicación en terapia requiere todavía un mejor entendimiento de su biología.

Las células madre adultas representan una población celular rara, es decir, su presencia en los tejidos es muy escasa. Como ejemplo, sólo una entre 10.000 o 15.000 células en la médula ósea es una HSC. Además, éstas se encuentran normalmente en un estado quiescente a la espera del estímulo que las active, y su ciclo celular suele ser relativamente largo. Todas estas características hacen que las células madre sean difícilmente manipulables *in vivo* y que su estudio sea costoso. De forma general, las células madre adultas se dividen generando células transitorias con un ciclo celular más corto y una tasa proliferativa mayor, que permiten la amplificación del número de células antes de dar lugar a la progenie madura. Esta jerarquía protege a la población de células madre, permite evitar la aparición de mutaciones debidas a replicación, y retrasar el agotamiento de la población original (Reya et al., 2001).

Un tipo especial de célula madre lo constituyen las células madre de la cresta neural (NCSC, *neural crest-derived stem cells*). Como se ha mencionado en el apartado 1.2, estas células están presentes de forma transitoria en el embrión de vertebrados y son capaces de generar una gran diversidad de células. Las NCSC han sido identificadas en diferentes momentos de la embriogénesis (Lo and

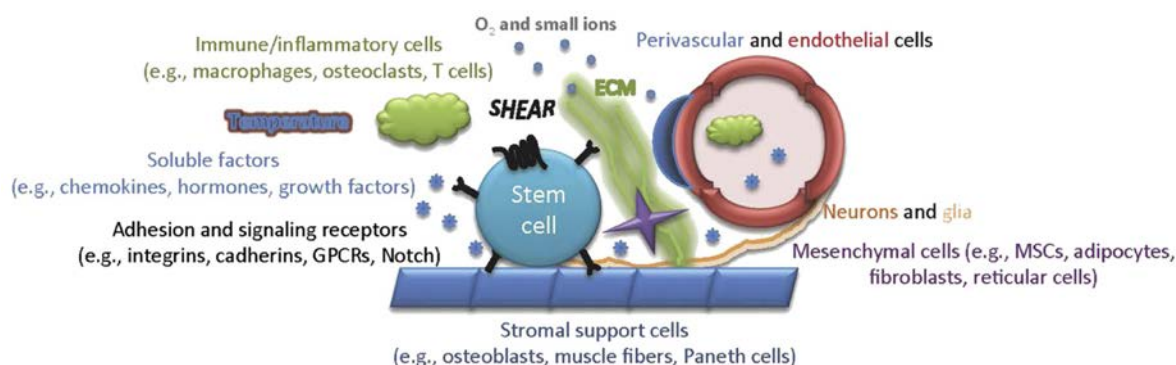
Anderson, 1995; Morrison et al., 1999; Bixby et al., 2002), y algunas poblaciones persisten en órganos y tejidos adultos (Kruger et al., 2002; Tomita et al., 2005; Yoshida et al., 2006; Pardal et al., 2007; Davies et al., 2010).

Debido a la importancia de las células madre para el organismo, estas células deben ser protegidas del daño o la pérdida, pero al mismo tiempo deben permanecer en contacto con los elementos que las rodean para poder responder apropiadamente a la demanda fisiológica y a las situaciones patológicas. Este balance entre protección e interacción es proporcionado por un microambiente especializado (Wang and Wagers, 2011; Wagers, 2012) que recibe el nombre de “*nicho de células madre*”. Este concepto fue introducido al observarse que las células madre hematopoyéticas poseían diferente capacidad proliferativa dependiendo del tejido de origen por lo que se propuso la idea de que ambientes especializados en los tejidos podían preservar el potencial proliferativo de las células madre y bloquear su maduración (Schofield, 1978). Por tanto, los nichos de células madres son microambientes dinámicos, que no sólo ofrecen soporte y protección a estas células, preservándolas de la depleción, sino que regulan su comportamiento; facilitando la conexión entre las células madre y la demanda fisiológica.

Los nichos están formados por numerosos y variados componentes que proporcionan las señales que regulan la actividad de las células madre (Figura 3). Entre estos componentes se encuentran diferentes tipos celulares del parénquima, como células mesenquimales, vasculares, neuronales o gliales; factores solubles, como Notch-1, Noggin o Sonic Hedgehog; componentes de la matriz extracelular, o parámetros físicos-químicos como la temperatura o la concentración de oxígeno.

Actualmente, la tensión de  $O_2$  es reconocida como un factor crítico para el mantenimiento de las células madre (Scadden, 2006), a pesar de que tradicionalmente no ha sido un parámetro a tener en cuenta en los estudios de cultivos celulares, ya que se asumía que el nivel ambiental ( $21\% O_2 \approx 160$  mmHg) era adecuado para el mantenimiento celular (Shooter and Gey, 1952). Mediciones directas en los tejidos han revelado que la  $PO_2$  en el organismo es más baja de la que se presumía, llegando a valores de entre el 2 y el 9 % de  $O_2$  (14-65 mm Hg) (Brahimi-Horn et al., 2007; Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2007). Estas condiciones del 2-9% de  $O_2$  han sido recientemente asumidas como normoxia fisiológica (Simon and Keith, 2008). La  $PO_2$  es especialmente baja en los nichos de células madre, donde se pueden alcanzar valores inferiores al 1% de  $O_2$  (Figura 4) (Mitchell and Yochim, 1968; Cipolleschi et al., 1993; Braun et al., 2001; Erecinska and Silver, 2001). Varios estudios han propuesto que la hipoxia en los nichos de células madre puede ofrecer una ventaja evolutiva, ya que las células sujetas a un metabolismo aerobio sufren más daño por estrés oxidativo debido a especies reactivas de oxígeno que pueden dañar los componentes celulares, particularmente el ADN (Cipolleschi et al., 1993; Busuttil et al., 2003). La tensión de oxígeno en una célula puede variar dependiendo de su entorno, del tejido, o incluso de las condiciones fisiopatológicas en las que se encuentre.



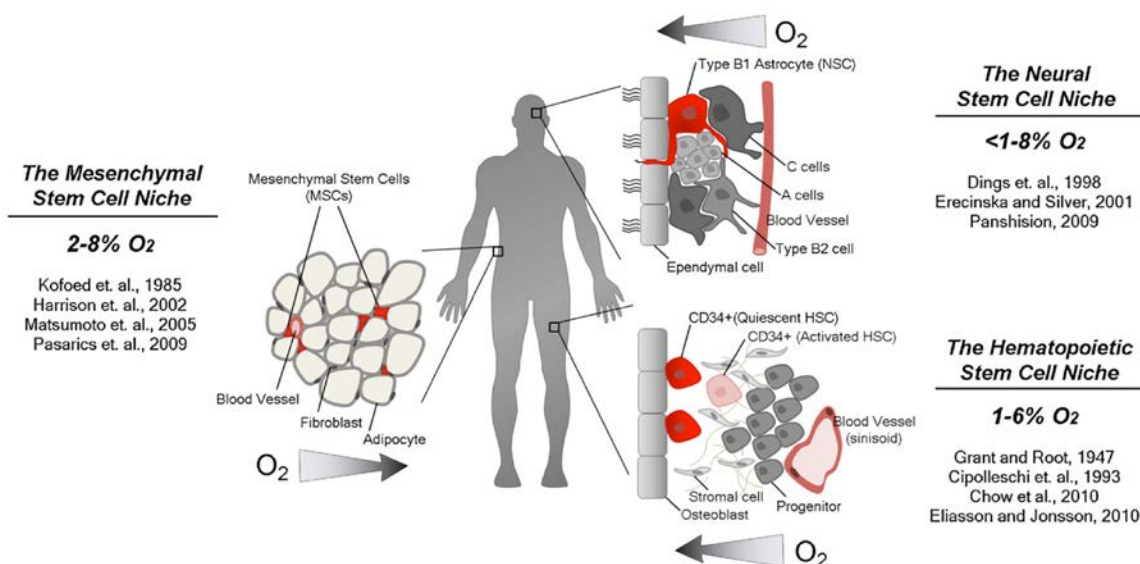


**Figura 3. Componentes del nicho de células madre.** Adaptado de Wagers, 2012.

A nivel molecular, la normoxia fisiológica es considerada hipoxia, ya que entre el 2 y el 9 % de  $O_2$ , en la célula se desencadena una respuesta molecular donde intervienen factores de transcripción inducidos por hipoxia (HIF, *hypoxia inducible factors*), canales iónicos sensibles a oxígeno, rutas de señalización específicas como la de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), o la respuesta al estrés del retículo endoplásmico (Semenza, 1999; Liu and Simon, 2004; Wouters et al., 2005). Además, en varios tipos de células madre, la hipoxia es capaz de activar vías de señalización que controlan Oct4 y la vía Notch, dos reguladores importantes de estas células (Simon and Keith, 2008).

El principal mecanismo de acción de la hipoxia sobre las células implica al factor de transcripción HIF. Está descrito en numerosos tipos celulares que la estabilización de este factor a bajas  $PO_2$  induce proliferación celular y, de hecho, está relacionado con varios tipos de cáncer. HIF es translocado al núcleo para activar la transcripción de sus genes diana. Para ello, es necesario que la subunidad HIF $\alpha$ , degradada en condiciones de normoxia, se una a la subunidad HIF $\beta$ , constitutiva. Las proil hidroxilasas (PHD) son las enzimas responsables de fosforilar a la proteína HIF $\alpha$  para activar su degradación. Sin embargo, en hipoxia las PHD no pueden funcionar, por lo que el factor HIF $\alpha$  es estabilizado, lo que permite la formación del dímero junto a HIF $\beta$  y la transcripción de los genes diana.

En el nicho de células madre también son destacadas las asociaciones entre los progenitores y el sistema vascular o el sistema nervioso. Estas asociaciones permiten la modulación del comportamiento de las células madre por señales metabólicas, ritmos circadianos o condiciones ambientales (Mendez-Ferrer et al., 2009; Chell and Frisen, 2012; Berg et al., 2013). La vasculatura es un elemento muy importante en el nicho debido a su función como productor y distribuidor de moléculas, proporcionando un conducto a través del cual factores solubles, células inflamatorias o del sistema inmune, y factores humorales, pueden llegar al nicho (Mendez-Ferrer et al., 2008; Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008; Christopher et al., 2011; Ehninger and Trumpp, 2011). El sistema nervioso actúa, a través de la actividad neuronal y la secreción de neurotransmisores, sobre los progenitores, haciendo que éstos puedan adaptarse a las condiciones ambientales (Andang et al., 2008; Song et al., 2012).



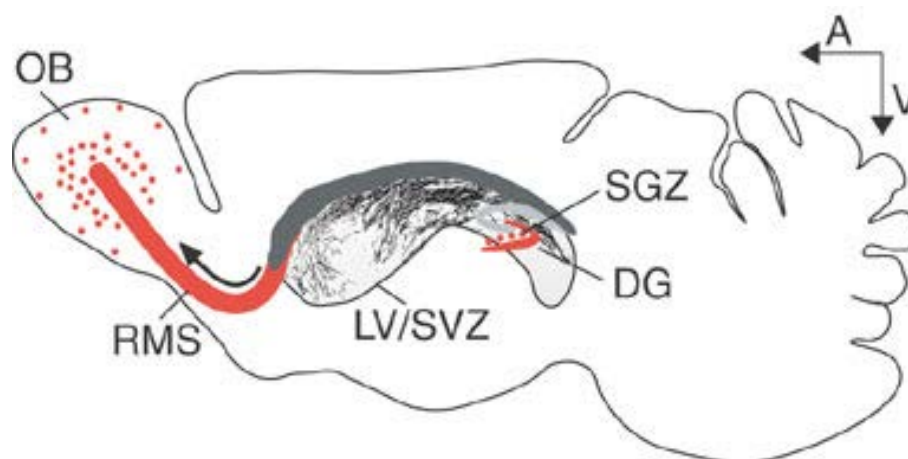
**Figura 4. Tensiones de oxígeno en diferentes nichos de células madre.** Adaptado de Mohyeldin et al., 2010.

Los componentes celulares y acelulares específicos que constituyen un nicho determinado pueden variar entre diferentes tejidos y condiciones fisiológicas. Sin embargo, en todos los casos, los diferentes microambientes sirven para integrar señales que regulan la biología de las células madre residentes, modulando la quiescencia, proliferación, diferenciación, muerte o supervivencia celular. De esta manera los nichos podrían ser importantes dianas para manipular la actividad de las células madre y potenciar su eficacia terapéutica.

### 3 Células madre neurales adultas; concepto y metodología de estudio

Las células madre adultas del sistema nervioso, denominadas células madre neurales (NSC, *neural stem cells*), tienen un interés especial dentro del contexto del presente trabajo debido a que a este grupo pertenecen las células madre del CC. Los primeros indicios de la existencia de NSC surgieron durante los años 60, por los trabajos realizados por Altman y sus colaboradores (Altman and Das, 1965). Antes de estos estudios prevalecía en la comunidad científica el dogma de que la producción de nuevas neuronas en el SNC se restringía a las etapas embrionarias y neonatales, y los posibles sistemas de reparación y la plasticidad del tejido neural se atribuían a eventos como la arborización de axones y dendritas, cambios en expresión de proteínas o reorganización sináptica (Ramon y Cajal). Esta idea se mantuvo hasta la segunda mitad del siglo XX, cuando se demostró la existencia de dos regiones en el cerebro de la rata adulta que contenían células proliferativas que se convertían en neuronas (Altman and Das, 1965). Durante la década de los 90, los estudios sobre la neurogénesis adulta sufrieron un gran impulso debido al avance de las nuevas tecnologías, y numerosos trabajos han demostrado desde entonces, que en ciertas partes del cerebro adulto, incluido el humano, se forman nuevas neuronas a partir de unas células que sufren procesos de proliferación y diferenciación.

Las NSC pueden generar los tres tipos celulares principales del cerebro: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Altman, 1969; Reynolds and Weiss, 1992; Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Weiss et al., 1996; Palmer et al., 1997; Doetsch et al., 1999a; Gage, 2000; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). La neurogénesis adulta en mamíferos se ha demostrado inequívocamente en dos zonas del cerebro: la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002) y la zona subgranular (SGZ) en el giro dentado del hipocampo (Kempermann and Gage, 2000) (Figura 5). También se ha propuesto la existencia de neurogénesis en otras zonas del cerebro que hasta el momento están menos consensuadas y caracterizadas, como son el bulbo olfatorio de roedores (Kornack and Rakic, 2001; Gritti et al., 2002) y la zona subcallosa (Seri et al., 2006). Existen trabajos algo controvertidos que han sugerido neurogénesis en la corteza cerebral (Gould et al., 1999) y en la sustancia negra (Zhao et al., 2003).



**Figura 5. Principales centros neurogénicos en el cerebro adulto.** Esquema de una sección sagital del cerebro adulto de mamíferos mostrando las dos zonas principales de neurogénesis adulta. LV, ventrículos laterales; SVZ, zona subventricular; DG, giro dentado; SGZ, zona subgranular; OB, bulbo olfatorio; RMS, cadena migratoria rostral; A, anterior; V, ventral. Adaptado de Doetsch, 2003.

Además de en el SNC, se han descrito células madre neurales en el sistema nervioso periférico (SNP) (Stemple and Anderson, 1992; Kim and Sun, 2012). Como se mencionó anteriormente, el SNP deriva de la cresta neural durante la embriogénesis (Le Douarin, 1980, 1986a). La cresta neural da lugar a progenitores de los que derivan las neuronas y la glía de los ganglios simpáticos, parasimpáticos, entéricos, y de parte de los ganglios sensoriales. Estos progenitores también dan lugar a las células de Schwann y a algunas células neuroendocrinas en tejidos como el CC, la médula adrenal, o la glándula tiroides. Varios grupos han puesto de manifiesto la existencia de NSC en el ganglio de la raíz dorsal (Li et al., 2007; Nagoshi et al., 2008), el sistema nervioso entérico adulto (Bixby et al., 2002; Kruger et al., 2002), o el CC (Pardal et al., 2007). Sin embargo las NSC de algunas de estas estructuras ven disminuido en gran medida su potencial neurogénico en el organismo adulto, siendo difícil caracterizar la formación de nuevas neuronas *in vivo* en estos tejidos. La función de las NSC en el SNP permanece elusiva excepto para el CC, donde se ha demostrado que la neurogénesis cumple una función fisiológica importante, ya que median el crecimiento adaptativo del órgano en respuesta a la hipoxia crónica (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014).



El estudio de las NSC es metodológicamente complejo debido a la relativa quiescencia de estas células, a la difícil accesibilidad del tejido nervioso y a la ausencia de marcadores de superficie específicos, por lo que estas células madre han sido caracterizadas de acuerdo a criterios funcionales y de comportamiento *in vitro*. El ensayo de neuroesferas ha sido durante muchos años la metodología más extendida para estudiar las NSC, permitiendo la evaluación de su capacidad de auto-renovación y diferenciación *in vitro*. Reynolds y Weiss (1992) fueron los primeros en cultivar células madre neurales como neuroesferas. Las neuroesferas provienen de la proliferación clonal de progenitores neurales cultivados a baja densidad celular, en condiciones no adherentes y en medio sin suero suplementado con EGF y FGF-2 (EGF, *epidermal growth factor* y FGF-2, *fibroblast-derived growth factor 2*) (Reynolds and Weiss, 1992; Gritti, 2001). Las neuroesferas no están formadas por una población homogénea de células, sino que están compuestas por una población mixta de NSC y sus derivados, pudiéndose encontrar progenitores restringidos y células diferenciadas entre la progenie. Para analizar la auto-renovación, las neuroesferas se disgregan de nuevo y se vuelven a cultivar para formar neuroesferas secundarias. El número de neuroesferas secundarias refleja el número de NSC que poseían las neuroesferas primarias. Cuando se siembran en sustrato adherente en ausencia de factores de crecimiento, las células se diferencian hacia neuronas y glía (Temple, 2001; Davies et al., 2010).

Actualmente se asume que el ensayo de neuroesferas, aunque permite evaluar el potencial de una célula para comportarse como célula madre cuando se aísla de su nicho fisiológico, cuenta con limitaciones que llevan a tener en cuenta consideraciones importantes a la hora de interpretar los resultados obtenidos en dichos experimentos (ver Tabla 1) (Pastrana et al., 2011). Cuestiones como que no todas las neuroesferas provienen de células madre (Reynolds and Rietze, 2005) o que el ensayo podría no detectar células madre quiescentes (Pastrana et al., 2009) hacen que estos estudios con neuroesferas no deban ser considerados suficientes por sí solos para definir células madre *in vivo*. Sin embargo, realizados con las precauciones adecuadas, la generación de neuroesferas se convierte en una herramienta fundamental que facilita el estudio de las NSC.

El descubrimiento de la persistencia de las células madre neurales en el adulto suscita numerosas preguntas sobre la capacidad de auto-regeneración fisiológica en el sistema nervioso, y abre las puertas a la investigación en el campo de la terapia celular de enfermedades que hasta la fecha parecían intratables. Las NSC proveen de nuevas estrategias para el reemplazamiento de neuronas perdidas en procesos neurodegenerativos o traumáticos, por lo que en los últimos años se han diseñado métodos para el estudio de la biología de estas células, cuyo conocimiento mejorará nuestra capacidad de utilizarlas en la medicina regenerativa.

Table 3. Overview of Critical Considerations for Sphere-Forming Assays	
Cell density and clonality of spheres	Cell density is critical parameter as it influences clonality. Spheres are prone to aggregation due to both intrinsic locomotion and to experimenter-induced movement. Clonality is only guaranteed by single cell plating. Important to ensure that spheres are due to proliferation of cells and not to aggregation.
Sphere-forming assays may not detect quiescent stem cells	Sphere forming assays predominantly detect cells that are poised for, or are actively undergoing, proliferation. Quiescent cells may not be capable of forming spheres, either due to intrinsic cell properties or due to lack of additional extrinsic signals needed for their activation in this assay.
Sphere-forming assays are not a read-out of in vivo stem cell frequency	Multiple populations in stem cell lineages, including both stem cells and transit amplifying cells, are able to form spheres that can be serially passaged and are multipotent. The long-term in vitro and in vivo potential of purified populations needs to be assessed.
Sphere size is not a read-out of in vivo stem cells	Large spheres are often assumed to arise from stem cells. However, independent of aggregation issues, sphere size simply reflects proliferation/ differentiation status and responsiveness to growth factors of the parental clone-forming cell.
Towards the prospective purification of sphere-forming cells	As FACS becomes an integral part of assaying the potential of different populations to form spheres, it is essential to ensure that enzymatic digestion does not alter surface-marker profiles (different enzymes result in markedly different surface profiles). In addition, the cell type specificity of individual markers needs to be validated in vivo.
Markers are dynamic	Purified populations reflect the state of a population at a given moment in time. Within a purified population, cells may be in different states or stages of the cell cycle. Markers commonly used to purify stem cells change their expression with the cell cycle. Cells can shuttle between quiescent and activated states or from more committed to more primitive states.
Differentiation potential bias due to culture with exogenous growth factors	Cells within a population may respond differently to distinct mitogens. Mitogens can also bias the differentiation capacity of cells.

**Tabla 1. Consideraciones críticas para ensayos de formación de esferas.** Adaptado de Pastrana et al., 2009.

### 3.1 Nichos neurogénicos en el sistema nervioso central

En el SNC de mamíferos, la neurogénesis adulta ocurre principalmente en dos regiones específicas: en la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales, que aporta neuronas al bulbo olfatorio, y en la zona subgranular (SGZ) del hipocampo. Aunque no se sabe con exactitud la función de la neurogénesis adulta, parece que ésta compensa la pérdida fisiológica de neuronas, participando en la homeostasis y regeneración del tejido. En el hipocampo se considera incluso que podría estar relacionada con mecanismos de formación de memoria y con el aprendizaje.

#### 3.1.1 La zona subventricular

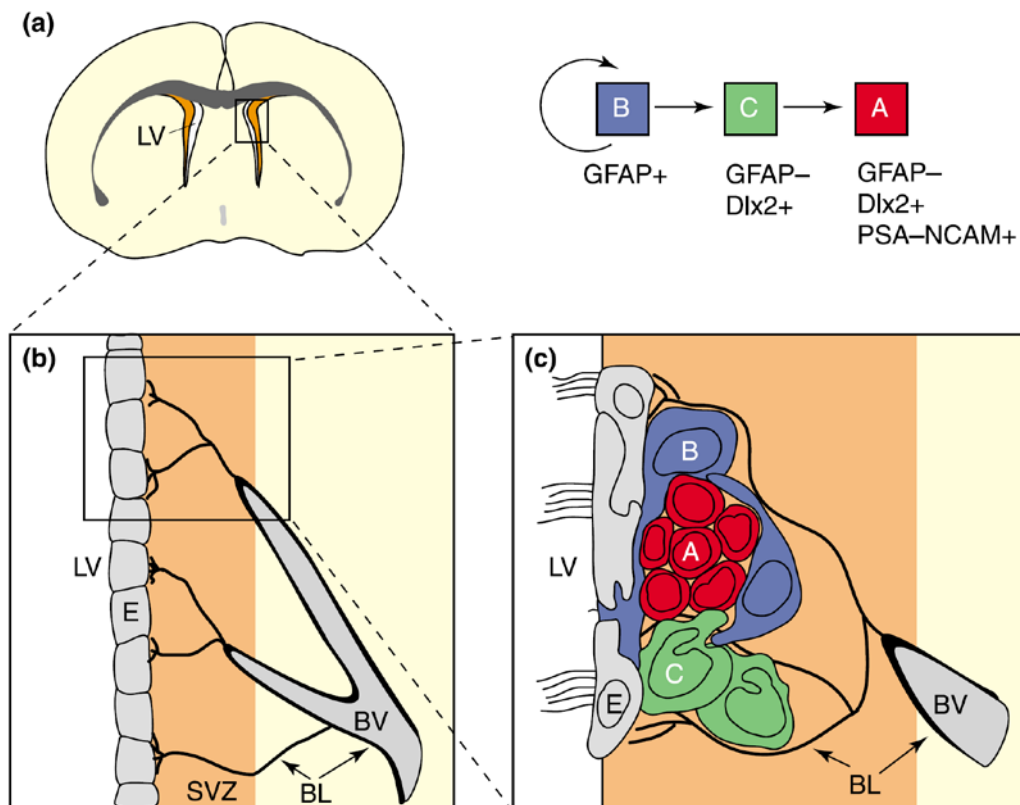
La SVZ es una capa de células proliferativas adyacentes al epéndimo que recubre los ventrículos laterales en las proximidades del núcleo estriado y que da lugar a neuronas que se incorporan al bulbo olfatorio (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). La composición celular y la arquitectura de la SVZ han sido bien descritas incluso a nivel ultraestructural (Doetsch et al., 1997; Doetsch and Scharff, 2001; Mirzadeh et al., 2008). Se pueden distinguir cuatro tipos celulares principales: astrocitos o células tipo B, progenitores o células tipo C, neuroblastos o células tipo A y células endodimales (Figura 6).

Los neuroblastos migran para incorporarse a una red de cadenas celulares tangenciales que convergen hasta formar el *camino migrador rostral* que llega al bulbo olfatorio, donde continúan migrando radialmente hacia sus posiciones finales. Allí se diferencian a dos clases de interneuronas: granulares y periglomerulares (Altman, 1969; Corotto et al., 1993; Lois et al., 1996). Los neuroblastos mantienen la capacidad de división durante su camino hacia el bulbo olfatorio. Estas células se distinguen del resto en la SVZ por la expresión del marcador PSA-NCAM (molécula de adhesión celular neuronal). La migración de los neuroblastos se produce a través de unos túneles formados por prolongaciones de células astrocitarias, llamados gliotubos, que, aunque no son indispensables, facilitan el

proceso mediante la secreción de factores específicos (Wichterle et al., 1997; Mason et al., 2001).

Las células B poseen características similares a las de los astrocitos del cerebro, como la expresión de la proteína fibrilar GFAP. Estas células han sido identificadas como los progenitores primarios de división lenta de la SVZ, y en estudios *in vitro* han demostrado comportarse como células madre. Las NSC de la SVZ provienen de la glía radial embrionaria (Merkle et al., 2004), y como ésta, están altamente polarizadas, contactando con la luz del ventrículo mediante un proceso apical corto y con los vasos sanguíneos, a través de un largo proceso basal. Este proceso basal contribuye a la formación del anteriormente mencionado gliotubo (Mirzadeh et al., 2008; Beckervordersandforth et al., 2010).

Las células C son progenitores intermedios de división rápida que se estructuran en pequeños grupos dispersos a lo largo de las cadenas de neuroblastos. Estas células poseen características estructurales de células inmaduras y expresan el marcador Nestina. Presentan la mayor capacidad proliferativa de la SVZ y dan lugar a los neuroblastos (Doetsch et al., 1997).



**Figura 6. Nicho neurogénico de la zona subventricular.** **A** Localización de la SVZ en el cerebro adulto de ratón y esquema de su linaje celular. **B** y **C** Detalle de la SVZ y de la distribución de los progenitores neurales. LV, ventrículos laterales; BV, vasos sanguíneos; B células tipo B; BL, lámina basal; C, células tipo C; A, neuroblastos; E, células endociliares. Adaptado de Doetsch, 2003.

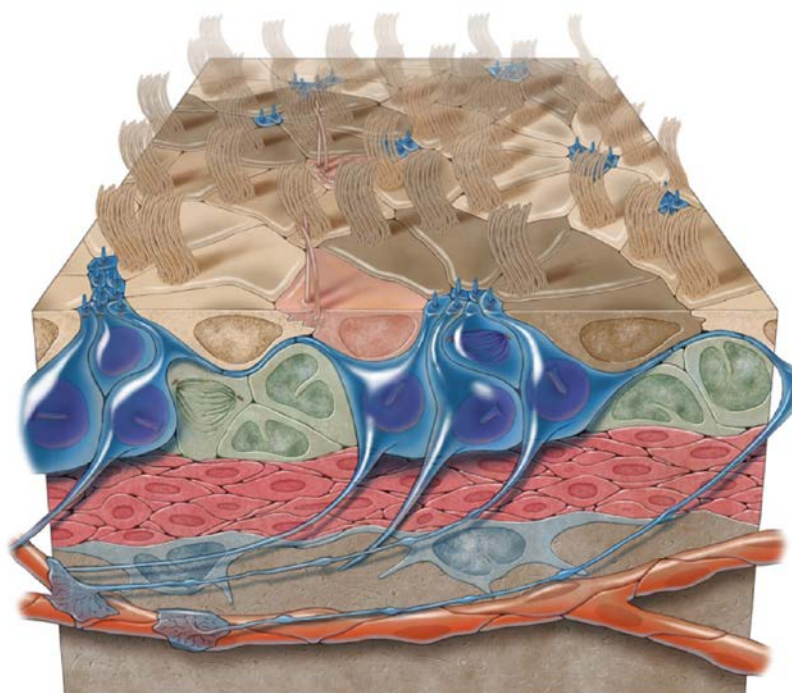
Las células endociliares expresan la proteína Prominina1 (CD133), y forman una monocapa que recubre las paredes de los ventrículos laterales. Estas células son en su mayoría multiciliadas y el movimiento de sus cilios mantiene la dirección del flujo del líquido cefalorraquídeo. Se ha demostrado que dicho flujo es importante

para la orientación de los neuroblastos en su migración hacia el bulbo olfatorio (Yamashita et al., 2006). Las células endodimales expresan el factor Noggin, el cual promueve la diferenciación neuronal inhibiendo la señalización de los BMP (*bone morphogenetic proteins*) (Lim et al., 2000). Todo ello parece indicar que las células endodimales participan en la generación de un ambiente apropiado para la neurogénesis en la SVZ. Algunos trabajos han sugerido que las células endodimales son capaces de actuar como células madre (Johansson et al., 1999), o que pueden re-entrar en ciclo proliferativo como progenitores multipotentes en respuesta a daño (Coskun et al., 2008). Sin embargo, estas hipótesis están sujetas a controversia y no han sido completamente demostradas (Mirzadeh et al., 2008). Según estudios recientes, aunque las células endodimales podrían formar neuroesferas, no son capaces de dar lugar a neuronas en condiciones fisiológicas (Carlen et al., 2009).

Como se ha señalado anteriormente, las células B de la SVZ, de fenotipo glial, son las que han sido identificadas como los precursores *in vivo* de las neuronas generadas *de novo* y las que actúan como células madre, tanto durante procesos regenerativos como durante la homeostasis fisiológica. Se ha establecido una secuencia de progresión de linaje en el que las células B se dividen para dar lugar a las células tipo C, que a su vez se dividen activamente amplificando la población antes de diferenciarse hacia células tipo A, los neuroblastos (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b), que son los que finalmente se convierten en neuronas (Figura 6).

Recientemente, se ha descubierto que las células tipo B están inmersas en la capa de células endodimales formando una estructura en forma de molino (Figura 7). El centro del molino está formado por el proceso apical de las células B. Rodeando a este proceso, distribuidas por la periferia, se encuentran las células endodimales (Mirzadeh et al., 2008). De este modo, las NSC de la SVZ son capaces de conectar la zona subventricular con la luz del ventrículo, para así transferir información entre estos dos compartimentos. Esta comunicación podría ser fundamental para la regulación de la neurogénesis adulta, ya que como se ha visto, el líquido cefalorraquídeo puede regular el comportamiento de las células de la SVZ. Además, en esta estructura las NSC permanecen en íntimo contacto con las células endodimales y están expuestas a señales derivadas de las mismas, como la molécula Noggin implicada en neurogénesis. Este tipo de organización en molino sólo aparece en las zonas neurogénicas de los ventrículos. Las células B intercaladas en la capa que recubre el ventrículo podrían ser las células identificadas erróneamente en otros estudios como las células endodimales con propiedades de células madre. Estas células madre que contactan con el ventrículo expresan la proteína Prominina1 (CD133), que se creía exclusiva de las células endodimales. De hecho, la combinación de los marcadores GFAP y CD133 ha sido utilizada para el enriquecimiento, mediante citometría de flujo, de una población purificada de células madre de la SVZ. Células aisladas GFAP/CD133 dobles positivas presentaban una eficiencia de formación de neuroesferas del 78%, una de las más altas descritas hasta la fecha (Beckervordersandforth et al., 2010).





**Figura 7. Modelo tridimensional del nicho de la SVZ adulta.** Células B en azul; células C en verde; neuroblastos en rojo; vasos sanguíneos en naranja; células endodiales en marrón claro y oscuro. Adaptado de Mirzadeh et al., 2008.

Un componente importante del nicho neurogénico subventricular lo constituye la vasculatura, que forma un extenso plexo de vasos sanguíneos interconectados que se expande a través de toda la SVZ. Tanto las células madre como los progenitores intermedios están íntimamente asociados a este plexo y contactan con los vasos en áreas especializadas que carecen de las prolongaciones de astrocitos y pericitos típicas de la barrera hematoencefálica, lo que hace a estas zonas altamente permeables (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). La red de vasos presenta una lámina basal, que se extiende desde los vasos sanguíneos y termina en unos pequeños abultamientos adyacentes a las células endodiales. De esta manera, la lámina basal pone en contacto a todas las células de la SVZ.

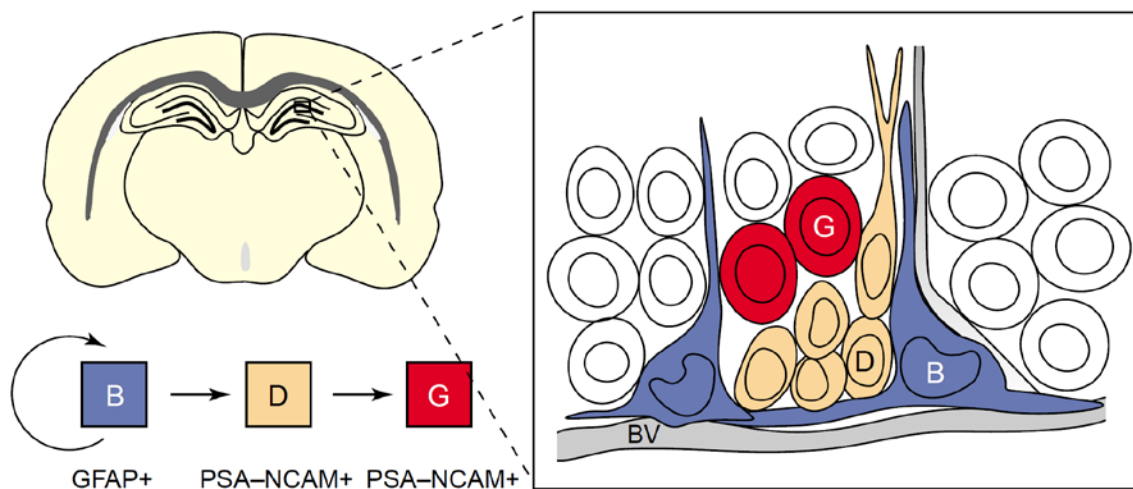
Además de generar neuronas, los progenitores de la SVZ pueden dar lugar a oligodendrocitos. Se ha demostrado que las células tipo C pueden dar lugar a células progenitoras de oligodendrocitos y a oligodendrocitos maduros mielinizantes *in vivo*, que se incorporan al cuerpo calloso, al estriado y a la fimbria. La formación de estas células se ve potenciada tras una lesión desmielinizante en el cuerpo calloso, por lo que se ha sugerido que las células madre adultas de la SVZ pueden participar en la reparación de lesiones de mielina (Buffo et al., 2005; Menn et al., 2006; Jackson and Alvarez-Buylla, 2008).

La neurogénesis en la SVZ es importante para la discriminación de olores. Sin embargo, los humanos parecen ser los únicos mamíferos en los que no se ha observado integración de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio (Sanai et al., 2011; Bergmann et al., 2012), probablemente debido a una reducción evolutiva a la dependencia del sentido olfativo. En la SVZ humana se generan neuroblastos durante la etapa post-embionaria, pero parece que estos se integran en el estriado adyacente para formar interneuronas (Ernst et al., 2014), lo que identifica un patrón de neurogénesis único en humanos.

### 3.1.2 La zona subgranular

Las neuronas granulares del giro dentado del hipocampo se generan localmente en la zona subgranular (SGZ), incorporándose posteriormente a la propia estructura neuronal adyacente, por lo que las células no tienen que realizar los extensos procesos migratorios que caracterizan a los neuroblastos de la SVZ (Kempermann and Gage, 2000). Las neuronas jóvenes del hipocampo migran una corta distancia alcanzando la capa granular. Desde aquí proyectan hacia la región CA3 del hipocampo, conectando con interneuronas y células piramidales, e integrándose en los circuitos neuronales.

La SGZ es una capa germinal que se encuentra entre el giro dentado y el hilio. Como en la SVZ, el precursor primario de las neuronas granulares son los astrocitos, también denominados células B. Estas células se dividen dando lugar a las células D, que cumplen la función de los precursores intermedios C de la SVZ. Las células D formarán las neuronas granulares (Figura 8) (Seri et al., 2001). A diferencia de las células C de la SVZ, las células D se dividen menos frecuentemente y están más diferenciadas, comenzando a mostrar marcadores de diferenciación neuronal (Palmer et al., 1997; Seri et al., 2001). Las células B extienden un proceso basal alineado con el borde del giro dentado y un proceso apical que se adentra en la capa granular. Todas estas células se encuentran fuertemente asociadas con el sistema vascular.



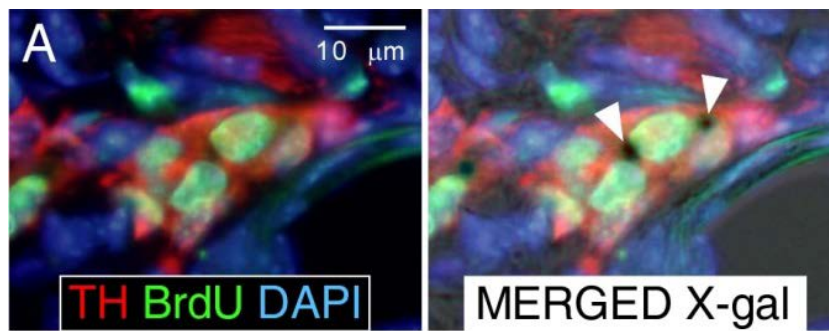
**Figura 8. Nicho neurogénico de la zona subgranular.** Se muestra en detalle la organización de las distintas células del nicho y el linaje celular. BV, vasos sanguíneos; B células tipo B; D, células tipo D; G, células granulares. Adaptado de Doetsch, 2003.

La neurogénesis en el hipocampo adulto parece estar implicada en el aprendizaje y la memoria (Kempermann and Gage, 2000; Shors et al., 2001). En humanos, la generación de neuronas en el hipocampo muestra un descenso mucho menos dramático durante el envejecimiento comparado con la neurogénesis en roedores (Eriksson et al., 1998; Spalding et al., 2013), sugiriendo un significado evolutivo donde se ha asegurado la adaptabilidad cognitiva.

### 3.2 Neurogénesis en el sistema nervioso periférico; el cuerpo carotídeo

A diferencia de otros órganos del SNP, el CC exhibe un alto nivel de plasticidad estructural. Este órgano quimiorreceptor crece aumentando varias veces su volumen en respuesta a hipoxia crónica incrementando el número de células glómicas neuronales. Cuando el organismo vuelve a un estado de normoxia, después de un periodo más o menos largo de hipoxia, lo que se denomina *renormoxia*, el CC recupera su tamaño original, volviendo a alcanzar aproximadamente el mismo número de neuronas que tenía inicialmente.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el incremento en el número de neuronas del CC durante la exposición sostenida a la hipoxia, se debe, en parte, a una población residente de NSC quiescentes (Pardal et al., 2007). Este hallazgo se basa en los resultados de estudios de proliferación realizados con BrdU (un análogo de la timidina que se incorpora en fase S proliferativa) en CC de ratón. En el CC de ratón, durante los primeros días de exposición a hipoxia, algunas células comienzan a proliferar. Sin embargo, no aparecen células glómicas marcadas con BrdU hasta el día 5 o 6 de la exposición. Este retraso en la aparición de células neuronales marcadas sugería la existencia de precursores cuya proliferación en hipoxia precediera a su diferenciación hacia células glómicas, las cuales heredarían el marcaje de BrdU (Pardal et al., 2007). Los progenitores del CC han sido caracterizados *in vitro* mediante ensayos de neuroesferas realizados con células procedentes de la dispersión de CC. Las neuroesferas contienen un número considerable de células que expresan Nestina, y a medida que crecen en tamaño, aparecen unos abultamientos en la periferia de la esfera formados exclusivamente por células que expresan el marcador tirosina hidroxilasa (TH). Estos abultamientos, denominados *blebs*, recuerdan en su estructura a los glomérulos de células glómicas en el CC y pueden llegar a alcanzar un tamaño similar a un CC completo, tras varias semanas en cultivo. Las células glómicas generadas *in vitro* a partir de neuroesferas tienen las mismas propiedades funcionales características de las células glómicas del CC (Pardal et al., 2007). No solo poseen canales iónicos voltaje-dependientes, sino que responden a la hipoxia e hipoglucemia con una actividad secretora y producen grandes cantidades de GDNF, factor trófico característico del CC. Las CMCC han mostrado tener una EFN del 1,04% de las células sembradas y generan neuroesferas que alcanzan un tamaño de unas 85  $\mu\text{m}$  de diámetro tras 10 días en cultivo. Ensayos de diferenciación sobre un sustrato adherente han demostrado que las neuroesferas, además de células TH+, dan lugar a células con capacidad migratoria que expresan SMA (*smooth muscle actin*), proteína típica de células de músculo liso (Pardal et al., 2007).



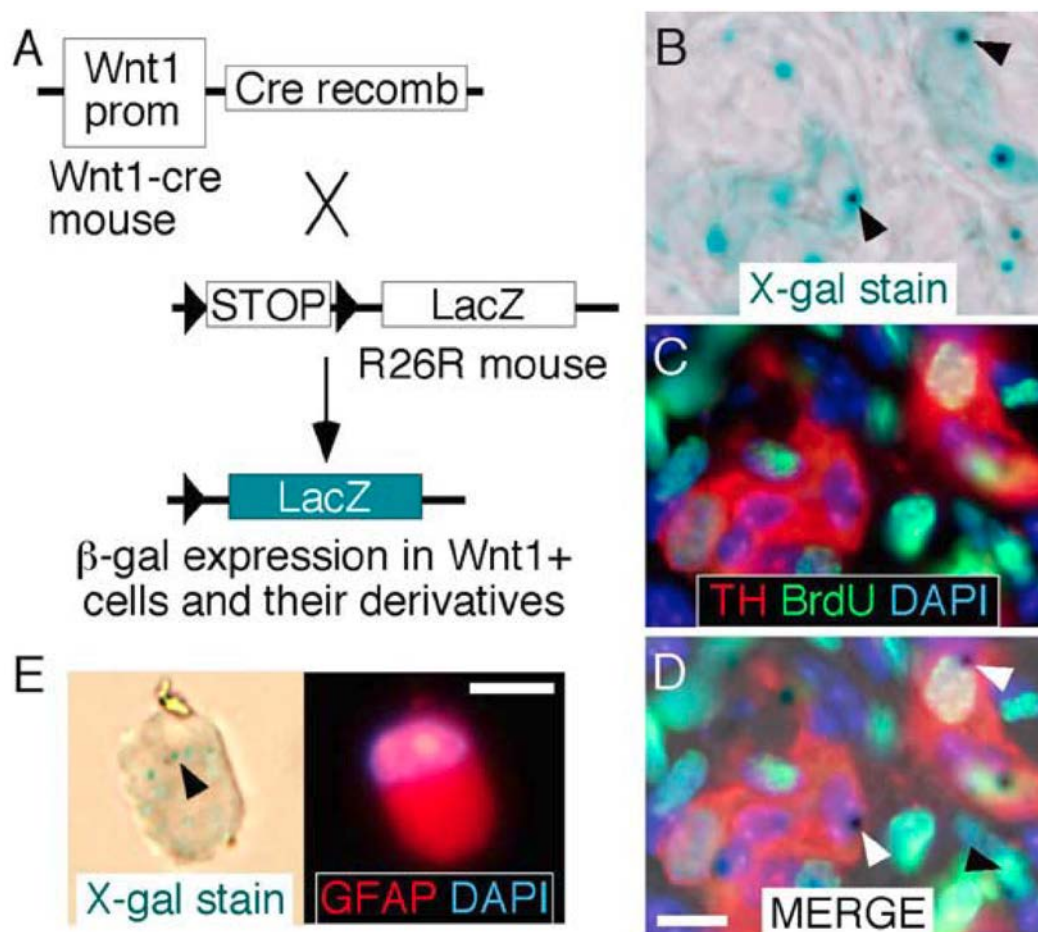
**Figura 9. Generación de nuevas células glómicas en el cuerpo carotídeo. A** Inmunohistoquímica en cortes de CC del ratón transgénico GFAP-Cre/flox LacZ en condiciones hipóxicas mostrando la tinción para TH, BrdU y DAPI (izquierda). Cuando la imagen se superpone con la tinción X-gal (derecha) se observan inclusiones X-gal, indicadas mediante puntas de flecha, en células glómicas (TH+) que por tanto derivan de células GFAP+. Modificado de Pardal et al., 2007.

Los progenitores del CC han sido identificados como las células sustentaculares o células tipo II, a las que clásicamente se les atribuía una mera función de sostén y acompañamiento en el órgano. Mediante experimentos de trazado de linaje celular usando el ratón transgénico GFAP-Cre/flox LacZ, se ha comprobado la presencia de depósitos de X-gal en las nuevas células glómicas generadas cuando el animal es sometido a hipoxia crónica (Figura 9). Además, neuroesferas procedentes de este modelo animal son capaces de generar células TH+ y células SMA+ que presentan estos depósitos de X-gal. El fenotipo glial de los progenitores del CC se ha corroborado mediante la separación de células GFP+ (*green fluorescent protein*) procedentes de células de CC transfectadas con una construcción que expresa EGFP ("enhanced GFP") bajo el promotor del gen GFAP. Estas células GFP+ incrementan unas 30 veces la EFN, indicando que efectivamente los progenitores neurales del CC son GFAP+ y corresponden a las células tipo II del órgano. Haciendo uso de un ratón Wnt1- Cre/flox LacZ, se ha demostrado que las células madre GFAP+ del CC proceden de la cresta neural. Este ratón expresa depósitos de X-gal en las células sustentaculares GFAP+ y en las células glómicas TH+ (Figura 10).

Las CMCC poseen una progresión a través de su linaje celular parecida a la observada en los nichos neurogénicos centrales de la SVZ y de la SGZ. Análisis *in vivo* con BrdU han mostrado que las células en división en los 2-3 primeros días de hipoxia son predominantemente células que expresan GFAP, que comprenden aproximadamente el 10,5% de las células del CC de rata en condiciones de normoxia. A partir de esos primeros días, las células GFAP desaparecen en favor de un aumento en el número de células Nestina+, que llegan a alcanzar el 15,4% del total y que comienzan también a proliferar. A partir de la semana de tratamiento aparecen células glómicas que heredan el marcaje BrdU.

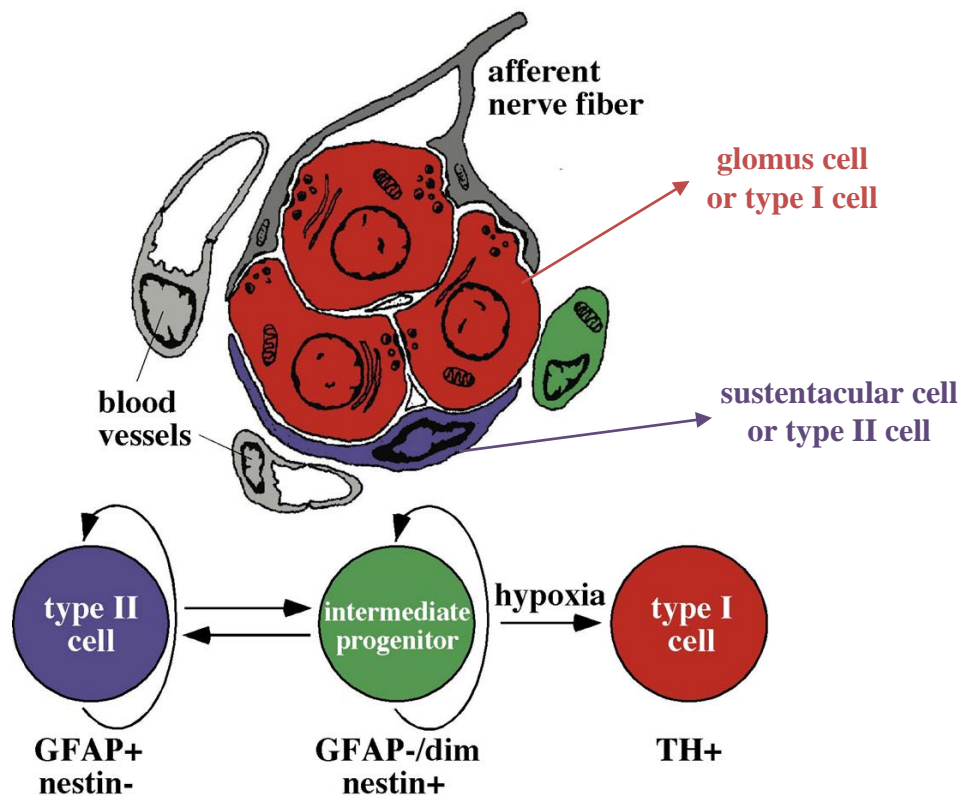
En base a estas observaciones se ha propuesto un modelo de progresión en el CC consistente en la existencia de una población quiescente de células madre con fenotipo glial GFAP positivo, que tras un estímulo sostenido de hipoxia, se activan y dividen para formar un progenitor intermedio. Este progenitor intermedio, que expresa la proteína Nestina, un marcador común en los progenitores neurales, prolifera y se diferencia hacia las células neuronales funcionales del CC (las células glómicas).





**Figura 10. Origen embrionario de las distintas células del CC.** **A** Estudio de las células derivadas de la cresta neural en el CC utilizando ratones Wnt1-cre/ flox lacZ. En este modelo animal las células Wnt1+ y sus derivados expresan la  $\beta$ -galactosidasa, y por lo tanto muestran un precipitado azul después de la tinción con X-gal. **B** Puntas de flecha señalando los precipitados azules de  $\beta$ -galactosidasa. **C** Inmunohistoquímica detectando de TH (rojo) y BrdU (verde) en la misma sección de tejido que en B. **D** Imagen superpuesta que ilustra que las células glómicas, tanto BrdU positivas como negativas (puntas de flecha blancas), derivan de la cresta neural. La punta de flecha negra indica una célula BrdU+, TH- y LacZ+ que podría representar un progenitor intermedio. **E** Ejemplo de una célula GFAP+, X-gal+ dispersa de CC de ratones Wnt1-cre/ flox.LacZ. Adaptado de Pardal et al., 2007.

El modelo neurogénico del CC comparte similitudes con los nichos neurogénicos del SNC descritos anteriormente. La naturaleza glial de la célula madre progenitora, la amplificación por medio de un progenitor intermedio, la formación de neuroesferas en cultivo, y la multipotencia de los progenitores, son algunos de estos aspectos. Sin embargo, al contrario de lo que pasa en otras regiones, en el CC se conoce el estímulo (la hipoxia) que desencadena la activación desde el estado quiescente de la célula madre neural. Esta característica convierte al CC en un modelo único para estudios relacionados con el estado de quiescencia, proliferación y diferenciación de las células madre neurales, pudiendo modular la actividad del nicho de forma experimental, mediante el control directo del estímulo.



**Figura 11. Glomérulo típico y linaje celular descrito a partir de la célula madre del cuerpo carotídeo.** Adaptado de Pardal et al., 2007.

#### 4 Regulación de la función de las células madre por los elementos del nicho y las condiciones ambientales

Las células madre se encuentran en general en un estado quiescente que favorece su mantenimiento y continuidad en los tejidos. Señales extrínsecas provenientes del nicho proporcionan información a estas células para que alteren su actividad y se adapten a las nuevas situaciones para hacer frente a las diferentes condiciones ambientales a las que está sujeta el organismo. El acoplamiento entre la demanda fisiológica y el comportamiento de las células madre es fundamental para entender el funcionamiento de los nichos de células madre y su función en los tejidos adultos (Chell and Frisen, 2012).

La función principal de los nichos neurogénicos es generar neuronas y en menor medida, otras células del sistema nervioso. Además de mantener a las células madre neurales en un estado quiescente indiferenciado, el nicho proporciona un ambiente propicio para la neurogénesis, y mantiene un balance en el número y tipo de progenie diferenciada según las circunstancias fisiológicas (Miller and Gauthier-Fisher, 2009). Aunque se han descrito multitud de moléculas implicadas en la regulación de las NSC, se conoce relativamente poco acerca de las señales y los mecanismos por los que las condiciones ambientales son capaces de modular la actividad de estas células para que se adapten a las nuevas situaciones. A este respecto, varios estudios han sugerido que la formación de nuevas neuronas en el hipocampo está dirigida por el aprendizaje y la experiencia. En el CC, la hipoxia constituye el principal estímulo ambiental que desencadena el proceso de neurogénesis que lleva al crecimiento de este órgano (Pardal et al.,

2007; Pardal et al., 2010), pero cómo se produce el acoplamiento entre la señal ambiental y la neurogénesis, constituye un mecanismo desconocido. A continuación, se resumen los estímulos y factores más relacionados con la investigación llevada a cabo en este trabajo sobre la regulación de las CMCC.

## 4.1 Hipoxia

Como se indicó anteriormente, la hipoxia parece ser un factor importante en la fisiología de las NSC del sistema nervioso central y periférico. Parece que la tensión de oxígeno está implicada en el mantenimiento de la auto-renovación, la multipotencia y el estado indiferenciado de las NSC, aunque también está relacionada con las decisiones de destino celular durante los procesos de diferenciación. Aunque muchos trabajos muestran que la hipoxia es capaz de promover un estado de indiferenciación en células madre neurales, potenciando su supervivencia y proliferación (Morrison et al., 2000; Studer et al., 2000; Chen et al., 2007a; Santilli et al., 2010), en algunos nichos específicos, las bajas concentraciones de O<sub>2</sub> favorecen la maduración neuronal de los progenitores. Ejemplo de ello es el cultivo de precursores mesencefálicos humanos, que cultivados al 3% de O<sub>2</sub> aumentan su proliferación y posterior diferenciación hacia células dopaminérgicas (Storch et al., 2001). En la SVZ, la hipoxia potencia el efecto del factor Noggin, secretado por las células endodiales e implicado en el mantenimiento de las células tipo B y en la diferenciación neuronal. Las NSC de la SVZ cultivadas al 20% de O<sub>2</sub> sufren parada del ciclo celular y potenciación de la diferenciación hacia el linaje glial (Chen et al., 2007a; Pistollato et al., 2007). Niveles reducidos de O<sub>2</sub> favorecen también la adquisición de un fenotipo catecolaminérgico en NCSC (Morrison et al., 2000).

A través de la vía proil-hidroxilasas-HIF, la hipoxia induce la expresión de factores solubles que pueden promover la proliferación de las NSC. Tal es el caso de la EPO (eritropoyetina) (Shingo et al., 2001) o el VEGF (Shweiki et al., 1992; Jin et al., 2002). La hipoxia es capaz de promover la proliferación de las NSC mediante la acción de la EPO sobre la vía de señalización del NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Esta vía activa a su vez la expresión de Mash1 (*mammalian achaete scute homolog-1*), un factor de transcripción que dirige a las NSC hacia el linaje neuronal (Shingo et al., 2001). Por lo tanto, parece que la tensión de oxígeno puede influenciar tanto el mantenimiento del estado de célula madre quiescente (*stemness*), inhibiendo su diferenciación, como las decisiones de destino celular específico.

La hipoxia se ha definido como un parámetro inherente a los nichos de células madre, ya que se ha encontrado que estas células residen en ambientes con concentraciones especialmente bajas de O<sub>2</sub> (Mohyeldin et al., 2010). Sin embargo, en el CC la hipoxia representa el factor que conduce a la neurogénesis, convirtiéndose en la señal ambiental que regula la respuesta de las CMCC a la demanda fisiológica (Pardal et al., 2007; Pardal et al., 2010).

## 4.2 Actividad neuronal

Recientemente se ha comprobado que las neuronas son capaces de regular el comportamiento de las células madre neurales. De este modo, la neurogénesis puede estar modulada por la experiencia y los estímulos ambientales. El control de la neurogénesis por la actividad neuronal constituye además un mecanismo de *feedback* por el cual la progenie madura puede influenciar sobre sus progenitores

para mantener un balance entre proliferación y diferenciación adecuado para el correcto funcionamiento del tejido (Liu et al., 2005; Andang et al., 2008).

La actividad neuronal es detectada por los progenitores a través de los neurotransmisores que son liberados por las terminaciones nerviosas que inervan los nichos o por las neuronas locales. Varios estudios de los últimos años han revelado que los neurotransmisores son un componente muy importante de los nichos de células madre, influenciando varios aspectos, desde la proliferación de los progenitores, hasta la maduración de las nuevas neuronas, su supervivencia y su integración sináptica (Hoglinger et al., 2004; Liu et al., 2005; Berg et al., 2011; Alfonso et al., 2012).

Generalmente, entendemos la señalización mediante neurotransmisores cuando éstos son liberados en las sinapsis, pero las posibles células diana también pueden ser activadas mediante la difusión de esos neurotransmisores desde sinapsis con otras células o por secreción no-sináptica. Es lo que se denomina *activación tónica*. Además, los receptores de los neurotransmisores se expresan en diferentes tipos celulares, como astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Incluso pericitos y células endoteliales del cerebro adulto expresan estos receptores y pueden ser regulados por neurotransmisores (Harik et al., 1981; Krimer et al., 1998).

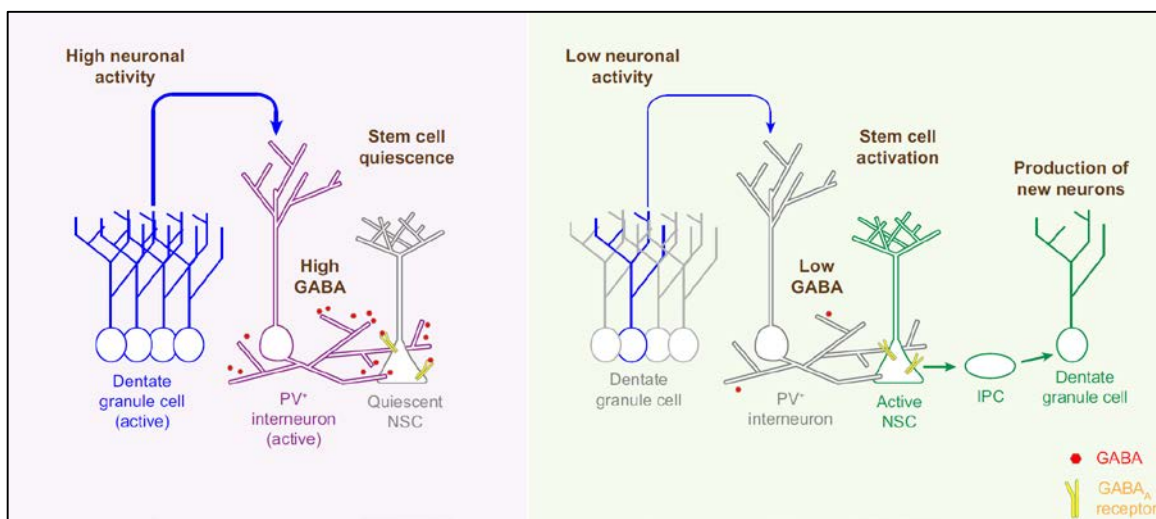
Entre los neurotransmisores involucrados en procesos neurogénicos, tanto en la SVZ como en el hipocampo se encuentran:

**Dopamina.** Varios trabajos han mostrado efectos de la dopamina sobre las células de la SVZ. La SVZ está inervada por fibras dopaminérgicas que proceden de la sustancia negra. Todos los precursores de la SVZ, desde las NSC hasta los neuroblastos, expresan receptores de dopamina. Animales modelo de la enfermedad de Parkinson con denervación de la vía nigroestriatal, muestran reducción de la proliferación de las células progenitoras de la SVZ e inhibición de la neurogénesis (Baker et al., 2004; Hoglinger et al., 2004; Winner et al., 2009; L'Episcopo et al., 2012).

**GABA** (*gamma aminobutyric acid*). Es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro, y es liberado por interneuronas y astrocitos. En la SVZ, los neuroblastos liberan GABA de manera no sináptica y no asociada a vesículas secretoras. El GABA liberado localmente inhibe la proliferación de las NSC proporcionando un mecanismo de control de la neurogénesis (Wang et al., 2003; Liu et al., 2005; Andang et al., 2008). Recientemente se ha mostrado que las neuronas granulares maduras del hipocampo modulan, indirectamente a través de un subgrupo de interneuronas gabaérgicas parvalbúminas positivas, el comportamiento de las NSC. Estas interneuronas liberan GABA cuando son activadas por las neuronas granulares, lo que mantiene la quiescencia de las NSC (Song et al., 2012) (Figura 12). El GABA parece actuar mediante su unión con otros factores que promueven la quiescencia de las NSC, como PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) o la vía de los BMP (Ming and Song, 2011). La señalización por GABA no ocurre vía sinapsis sino por un proceso que se ha denominado *spill-over*, que consiste en que el factor vertido en los contactos sinápticos puede ser también recogido por los progenitores de la zona. Cuando la señalización por GABA se pierde, debido a la disminución de la actividad de las neuronas granulares, la proliferación de las NSC se activa para formar nuevas neuronas. Utilizando un modelo de aislamiento social en ratones, que está descrito que reduce la actividad neuronal y promueve la expansión de la población de progenitores en el giro dentado (Ibi et al., 2008; Dranovsky et al., 2011), se ha demostrado que la



experiencia regula el comportamiento de las células madre neurales a través de este mecanismo de liberación de GABA (Song et al., 2012). Este modelo de regulación de la neurogénesis por la actividad neuronal en el hipocampo pone de relieve cómo las condiciones fisiológicas, concretamente un estímulo ambiental como el aislamiento social, regulan la quiescencia y la proliferación de las células madre neurales, y cómo éstas son capaces de adaptarse a esa nueva situación por medio de la detección de la actividad neuronal.



**Figura 12. Regulación de la neurogénesis por actividad neuronal en el hipocampo.** Adaptado de Chell y Frisen, 2012.

### 4.3 Endotelinas

Las endotelinas son una familia de péptidos activos con una gran influencia sobre el sistema nervioso y especialmente sobre las células derivadas de la cresta neural (Yanagisawa et al., 1988; Firth and Ratcliffe, 1992). Las endotelinas funcionan como neuropéptidos en el sistema nervioso. Entre sus funciones están la modulación de los centros cardiorrespiratorios, la secreción de algunas hormonas del eje hipotálamo-hipofisario, la contracción del músculo liso no vascular, la biosíntesis de aldosterona, y la modulación de la liberación de neurotransmisores. Las células gliales también son sensibles a las endotelinas. Los astrocitos producen endotelina-1 (ET-1) y poseen sus receptores (Ehrenreich et al., 1991), e incluso se ha demostrado un efecto mitogénico de ET-1 sobre estas células (Hama et al., 1992; Battistini et al., 1993).

Las endotelinas están involucradas en procesos de especificación y migración durante el desarrollo en las células de la cresta neural (Hosoda et al., 1994; Shin et al., 1999; Bonano et al., 2008). También pueden comportarse como potentes mitógenos y promover la supervivencia de algunas de estas células, actuando solas o en colaboración con otros factores. La señalización a través de ET-1/ET-RA parece ser necesaria para el mantenimiento de la cresta neural en etapas tempranas, promoviendo su supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis, y controlando su especificación (Bonano et al., 2008). La endotelina-3 (ET-3) ha mostrado tener un fuerte efecto mitogénico sobre cultivos de células madre de la cresta neural, promoviendo la supervivencia, proliferación y auto-renovación (Lahav et al., 1998; Trentin et al., 2004), sobre todo en progenitores precursores de

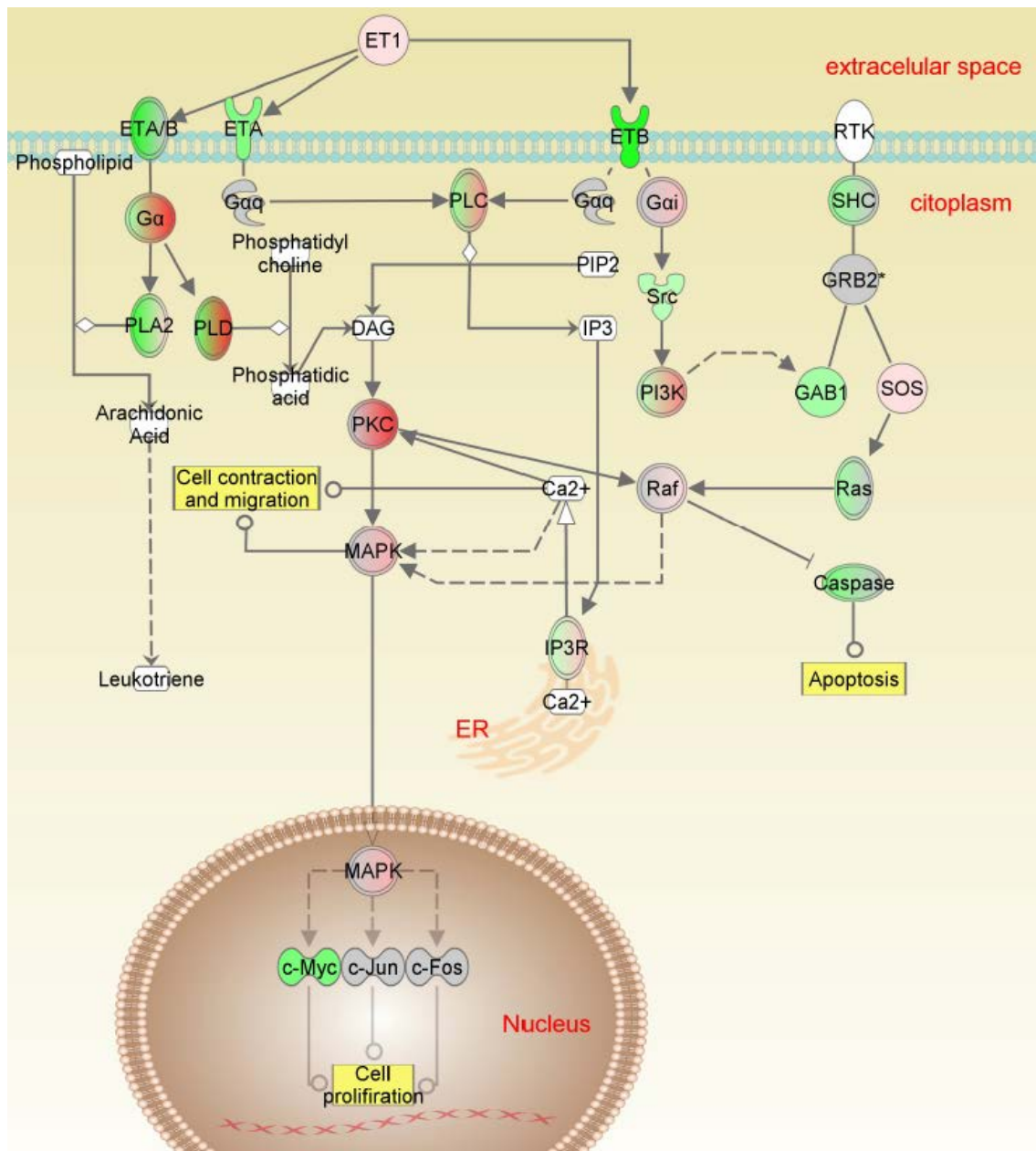
melanocitos (Dupin and Le Douarin, 2003; Saldana-Caboverde and Kos, 2010). La señalización a través del receptor de endotelina tipo parece ser requerida para la migración de los progenitores de la cresta neural durante del desarrollo del sistema nervioso entérico (Kruger et al., 2003) y también para la migración de melanoblastos en etapas concretas de la embriogénesis (Shin et al., 1999).

La familia de las endotelinas está formada por 3 péptidos de 21 aminoácidos con una elevada homología entre ellos (ET-1, ET-2 y ET-3) (Yanagisawa et al., 1988). La expresión de estos genes está regulada por mecanismos autocrinos y factores físico-químicos, tales como fuerzas mecánicas, cambios en la tensión de oxígeno, cambios en el pH, angiotensina II, vasopresina, noradrenalina, TGF $\beta$  (*transforming growth factor beta*), TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*), interleuquina-1, insulina, bradiquinina, entre otros.

El mecanismo de liberación de las endotelinas no se conoce con exactitud. En la mayoría de los casos no parece estar asociado a gránulos de secreción, con excepción de la hipófisis posterior, donde parecen existir gránulos con estos péptidos (Simonson and Dunn, 1991). Las endotelinas tienen una vida media muy corta en el plasma y son degradadas rápidamente tras su secreción, por lo que parece que la acción de las endotelinas es de tipo paracrina (Lovenberg and Miller, 1990; Abassi et al., 1992).

Se han caracterizado principalmente dos tipos de receptores para las endotelinas (Reynolds et al., 1989; Warner et al., 1992). ET-RA (*endothelin receptor type A*) que presenta mayor afinidad por ET-1 y ET-2, y ET-RB (*endothelin receptor type B*), que tiene una afinidad similar por las tres formas de endotelinas. La actividad fisiológica, la proporción, y el tipo de receptor presente en los diferentes sistemas se han caracterizado mediante estudios farmacológicos con péptidos agonistas y antagonistas, como el antagonista inespecífico PD145065 utilizado en este trabajo. Más tarde, se han diseñado antagonistas no peptídicos de pequeño peso molecular que pueden ser administrados oralmente y, por tanto, pueden constituir una herramienta terapéutica en el tratamiento de aquellas patologías en las que se encuentran implicadas las endotelinas. Tal es el caso del bosentan (Clozel et al., 1993; Clozel et al., 1994), que también es utilizado en este trabajo, y el cual bloquea los dos tipos de receptores, o el PD156707 (Harland et al., 1998), que es específico para ET-RA.

Las endotelinas no se transcriben como péptidos funcionales, sino como péptidos inmaduros que necesitan ser procesados. El mecanismo de transducción de señales a partir de ET-1 es complejo (Figura 13) e involucra al calcio como segundo mensajero en respuestas inmediatas como las contracciones musculares, y a vías de señalización como la ruta de las MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) que inducen procesos de proliferación y migración a través de la expresión de genes como *c-Fos*, *c-Jun* y *c-Myc*.



**Figura 13. Esquema de la ruta de señalización activada por ET-1.** Obtenido mediante el software IPA de la plataforma Ingenuity.

Las endotelinas parecen contribuir a la regulación de las funciones del CC (McQueen et al., 1995; Chen et al., 2000). ET-1 administrada sistémicamente causa quimio-excitación del nervio del seno carotídeo e hiperventilación en ratas, y esta hiperventilación es abolida seccionando ambos nervios del seno carotídeo (McQueen et al., 1995). Se ha descrito por numerosos grupos la presencia de endotelinas en las células glómicas del CC, y su expresión y la de su receptor ET-RA aumentan en condiciones de hipoxia (McQueen et al., 1995; Paciga et al., 1999; Chen et al., 2000). Además de afectar a la respuesta a la hipoxia aguda, las endotelinas parecen estar implicadas en la adaptación del CC a la hipoxia crónica. La presencia de endotelina y ET-RA en las células glómicas sensibles al oxígeno parece estar relacionada con el incremento de la quimio-sensibilidad causado por la hipoxia crónica (Chen et al., 2000; Chen et al., 2002). Se ha propuesto que la ET-



1 endógena liberada por las células glómicas podría actuar como mitógeno durante condiciones de hipoxia mantenida, ya que se ha observado que ET-1 estimula la incorporación de BrdU en dichas células (Paciga et al., 1999). Los efectos de las endotelinas en la proliferación del CC pueden ser inhibidos usando antagonistas. El bosentan reduce la hiperplasia de las células glómicas y la expansión de la matriz de tejido conectivo provocada por la hipoxia en el CC (Chen et al., 2007a). En el presente trabajo exploraremos el posible papel que puedan jugar las endotelinas en la fisiología de las CMCC.

# OBJETIVOS

---

El objetivo general de la presente tesis doctoral consiste en profundizar y contribuir al conocimiento de la biología de las células madre neurales del cuerpo carotídeo. Se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de los mecanismos y factores implicados en la activación y salida de la quiescencia de las células madre neurales del cuerpo carotídeo durante el estímulo de hipoxia crónica.
2. Estudio de los fenómenos de proliferación y diferenciación de los progenitores del cuerpo carotídeo.
3. Descripción de genes, moléculas y rutas de señalización importantes en el mantenimiento de la multipotencia de los progenitores del cuerpo carotídeo.
4. Identificación de marcadores de membrana para la optimización de la purificación de progenitores del cuerpo carotídeo.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1 Estudios in vivo

### 1.1 Animales

En este trabajo se han utilizado ratas Wistar y ratones de varias cepas, tanto de fenotipo silvestre como ratones modificados genéticamente, con edades comprendidas entre las 3 semanas y los 3 meses. Los roedores fueron estabulados y suministrados por el Animalario de la Universidad de Sevilla, por el Servicio de Producción y Experimentación Animal del Instituto de Biomedicina de Sevilla y por los Laboratorios Charles River (España). La estabulación se realizó en condiciones de temperatura constante ( $22\pm 1$  °C), con ciclo alternante de luz-oscuridad de 12 h, y con libre acceso al alimento y al agua. Para el manejo experimental y su posterior sacrificio los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina, a una dosis de 80/10 mg/kg respectivamente. Ambas drogas fueron suministradas por la Farmacia del Hospital Virgen del Rocío.

En todos los experimentos se siguieron las normas recogidas en la guía de cuidados animales de la Unión Europea (86/609/EEC), y todos los procedimientos experimentales de este estudio fueron aprobados por el Comité para la Investigación Animal de la Universidad de Sevilla.

Los modelos genéticos de ratones *knockout* condicionales utilizados en los experimentos usan la tecnología de recombinación Cre-LoxP con diferentes promotores de genes de interés.

- Los ratones TH-SDHD fueron generados, criados y genotipados como se indica en una publicación anterior de nuestro laboratorio (Díaz-Castro et al., 2012). Estos animales llevan la recombinasa Cre bajo el promotor TH y tienen floxeado el gen SDHD.
- Los ratones GFAP-HIF1 $\alpha$  se generaron cruzando ratones HIF-1 $\alpha^{fl/fl}$  (Ryan et al., 2000) (Jackson Laboratories) con ratones con la construcción GFAP-Cre (Zhuo et al., 2001) (Jackson Laboratories) obteniéndose la línea GFAP-Cre/HIF-1 $\alpha^{fl/fl}$ .
- Los ratones transgénicos TH-EGFP (Gong et al., 2003) se obtuvieron de MMRRRC (Mutant Mouse Regional Resource Centers) y presentan la proteína fluorescente verde (GFP) asociada a la expresión del gen TH.

### 1.2 Administración de bromodesoxiuridina

La bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma) es un nucleótido sintético análogo de la timidina que se intercala en el ADN cuando la célula está en fase S del ciclo celular. Este compuesto se utilizó para marcar proliferación celular en el CC. La administración de BrdU se llevó a cabo de dos formas: mediante inyección intraperitoneal y/o disuelto en el agua de bebida. Para la inyección se usó una dosis de 50 mg de BrdU por Kg de animal, diluido en solución salina estéril. Para la administración en el agua de bebida, el BrdU se disolvió a una concentración de 1 mg/ml. Debido a la sensibilidad del BrdU a la luz, el biberón donde era dispensado fue envuelto en papel de aluminio. El régimen de administración dependió del tipo de marcaje que se quería conseguir para cada experimento concreto. Para el curso

temporal de crecimiento del CC en hipoxia crónica y para el experimento con ratones GFAP-Cre/HIF-1 $\alpha^{fl/fl}$  se utilizó una inyección de BrdU semanal y los animales se mantuvieron todo el periodo del experimento con el agua con BrdU. Para el experimento de inhibición de la proliferación mediante bosentan se eligió una sola inyección de BrdU al principio del experimento y se prescindió de la administración en el agua de bebida.

### 1.3 Tratamiento de hipoxia crónica mediante cámaras isobáricas

Los animales fueron expuestos a una hipoxia crónica del 10% de O<sub>2</sub> en unas cámaras herméticas isobáricas especialmente diseñadas para ello (Coy Laboratory Products, Inc.). Estas cámaras cuentan con controladores de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, y monitorizan humedad y temperatura. Las cámaras se manipularon aproximadamente una vez al día para suministrar agua, comida, o las drogas utilizadas para cada experimento. Debido a la existencia de una esclusa con doble puerta, estas cámaras pueden manipularse sin que se alteren las condiciones del interior.



**Figura 14. Cámara de hipoxia para animales.** Fotografía de la cámara de hipoxia utilizada para someter a los animales a un tratamiento crónico de hipoxia (10% de O<sub>2</sub>), manteniendo en niveles normales otras variables como temperatura, humedad relativa o nivel de CO<sub>2</sub>.

### 1.4 Administración de fármacos

Debido a que el estrés causado a los animales puede interferir en el análisis de los datos recogidos en los experimentos, los roedores fueron tratados con la máxima prudencia y cuidado a fin de que la administración continua de drogas alterasen lo menos posible su estado de excitación. Aun así, siempre se llevaban animales control sujetos exactamente a la misma manipulación, pero tratados con vehículo en lugar de con las drogas.

#### 1.4.1 Bosentan

El bosentan (4-tert-butyl-N-[6-(2-hidroxietoxi)-5-(2-metoxifenoxi)-2-(pirimidin-2-il)pirimidin-4-il]benceno-1-sulfonamida) fue generosamente cedido por la Dra. Martine Clozel de Actelion Pharmaceuticals, quien nos proporcionó también las instrucciones para su utilización.

Este producto se administró a los animales a una dosis de 100 mg/Kg/día mediante una sonda intragástrica de 20 G durante 14 días. Estos 14 días comprendieron un periodo de 7 días de pretratamiento con la droga, en condiciones de normoxia, y un periodo de 7 días donde los animales eran ya introducidos en la cámara y sometidos a hipoxia crónica. El bosentan se disolvió en agua con goma arábica al 5%. La goma arábica debe disolverse en agua mediante agitador eléctrico (Selecta) durante una hora y filtrarse con papel de filtro antes de añadirle la droga. El bosentan se añadió a una concentración de 100 mg en 4 ml, microsuspendiéndolo con un homogenizador (PRO Scientific Inc.) durante 1 minuto. Esta solución se almacenó a 4 °C y se preparó fresca cada dos días durante el experimento. Los animales control recibieron la goma arábica sin el bosentan.

#### 1.4.2 Cloruro de cadmio

El cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ; Sigma) se inyectó a los animales intraperitonealmente a una dosis de 1 mg/Kg/día disolviéndolo en solución salina estéril. El tratamiento se realizó durante 3 días, que comprendían 1 día de pretratamiento en normoxia y 2 días bajo exposición a hipoxia. El compuesto se mantuvo a 4 °C y debido a su estabilidad podía ser utilizado durante todo el experimento.

#### 1.4.3 Dimetiloxalilglicina

El Dimetiloxalilglicina (DMOG; Frontier Scientific) fue administrado 2 veces al día a una dosis de 80 mg/Kg mediante inyección intraperitoneal. El DMOG se disolvió en solución salina estéril. Esta solución puede almacenarse a 4 °C durante un máximo de 24 horas. Las ratas se trataron con DMOG durante 3, 7 o 14 días.

### 1.5 Técnicas histológicas

Las técnicas histológicas realizadas en esta tesis doctoral comprendieron dos tipos de tratamiento de los tejidos según los anticuerpos utilizados para el marcaje celular: fijación de los tejidos por perfusión intracardiaca y preparación de tejidos no fijados.

#### 1.5.1 Perfusión intracardiaca

Tras ser anestesiados (ver más arriba), los animales fueron sometidos a perfusión intracardiaca. Primero se les perfundió con tampón fosfato salino (PBS; 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (Sigma)), para retirar la sangre de los tejidos, y a continuación se utilizó una solución de paraformaldehído (PFA; Sigma) al 4% en PBS (pH 7,4) para la fijación rápida y eficiente de todos los órganos. La infusión de las soluciones se realizó con una bomba peristáltica automática (High Precision Multichannel Pump, ISMATEC). Posteriormente, se diseccionaron y limpiaron los tejidos de interés, y seguidamente se sumergieron en la misma solución fijadora durante 2 horas a 4 °C en agitación leve. Tras la postfijación, los tejidos se lavaron un par de veces con PBS y se sumergieron en una solución de sacarosa (Sigma) al 30% en PBS, para su crioprotección, durante 24-30 horas, hasta que el tejido decantara por completo.

#### 1.5.2 Inclusión de tejidos y corte

Los tejidos se incluyeron en resina criopreservante (OCT, Tissue Tek, Electron Microscopy Sciences) utilizando moldes de plástico (Cryomold, Tissue Tek, Electron Microscopy Sciences). A continuación, los bloques se congelaron sobre pastillas de nieve carbónica y posteriormente se almacenaron a -80 °C hasta su

corte. Los cortes se realizaron mediante un criostato (Leica), a una temperatura que podía oscilar entre -23 y -29 °C. Se llevaron a cabo cortes seriados con un grosor de 10 µm. Estas secciones de tejidos se recogieron sobre portaobjetos adherentes (Superfrost Plus, Thermo Scientific) y se conservaron a -20 °C.

### 1.5.3 Preparación de tejidos frescos

Ciertos anticuerpos no funcionan bien sobre tejidos fijados con aldehídos, por lo que hubo que preparar también tejidos no fijados. Estos animales fueron anestesiados de igual modo, pero no perfundidos. Se disecaron directamente sus tejidos, que fueron lavados con PBS frío e incluidos en el criopreservante. Los bloques se congelaron y cortaron del mismo modo que en el apartado anterior (sección 1.5.2.), con la excepción de que los portaobjetos con las secciones se conservaron a -80 °C. Para su utilización en técnicas de inmunodetección, estos portaobjetos fueron extraídos del congelador y sumergidos rápidamente en acetona fría. Se mantuvieron en acetona (Sigma) durante 10 minutos a -20 °C. Tras ese tiempo, los portaobjetos se secaron al aire durante 15-30 minutos para permitir a la acetona evaporarse por completo.

## 1.6 Inmunofluorescencia en secciones de cuerpo carotídeo

Para realizar los marcajes con anticuerpos se usaron bandejas de incubación opacas para mantener las muestras en oscuridad. Los portaobjetos extraídos del congelador se depositaron en estas bandejas, y las secciones se cubrieron rápidamente, sin dejarlas secar, con PBTx al 0,3% (PBS con Tritón X-100 (Sigma) al 0,3%) durante 5 minutos. Este lavado se repitió 2 veces. Para los cortes destinados a la detección de BrdU, fue necesario realizar un paso de desnaturalización del ADN mediante el tratamiento de las muestras con HCL 2N (Sigma) durante 45 min a temperatura ambiente (RT), seguido de una neutralización del ácido mediante un lavado con tampón borato (Sigma) 0,1M a pH 8,5 durante 15 min, y 3 lavados de 5 min con PBTx al 0,3%. A continuación, se procedió con el protocolo general, que continuaba con el paso de bloqueo de las uniones inespecíficas. Para ello, las secciones se incubaron con solución de bloqueo (10% suero de cabra (Gibco), 1% albúmina bovina (Sigma), y 0,3% Tritón X-100, en PBS) durante 1h a RT. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Cuando la muestra se marcaba con 2 anticuerpos primarios, éstos se podían diluir juntos en la misma solución para ser incubados al mismo tiempo, siempre que se hubiera descartado la interacción entre ambas inmunoglobulinas. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBTx al 0,3%, y la incubación de las muestras con los anticuerpos secundarios (ver tabla 3) durante 1-2 horas a RT. Finalmente, se lavaron los anticuerpos secundarios 2 veces durante 5 min con PBTx al 0,3%. Para marcar los núcleos se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, BIOLINK) a una concentración 1:1000 en PBS durante 10 min. Por último, se realizó un lavado con agua destilada y las muestras se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia (Fluoro-gel, Electron Microscopy Sciences) y con un cubreobjetos para su posterior análisis mediante microscopía.

Los tejidos fijados con acetona se utilizaron para la detección de CD31. Este anticuerpo se une a un epítipo de membrana de las células endoteliales y no requiere permeabilización. Por ello, en los pasos que se han mencionado anteriormente se usaron las soluciones sin Tritón X-100 y los lavados fueron realizados con PBS, para mantener la membrana sin permeabilizar.



## 1.7 Adquisición de imágenes

Todas las fotos fueron guardadas en formato TIFF (Tagged Image File Format), el cual permite la máxima calidad en las imágenes. Las imágenes de fluorescencia de rodajas de CC, neuroesferas o células dispersas, fueron adquiridas mediante el microscopio Olympus BX-61 con cámara digital asociada, con el objetivo 20X y en escala de grises. Para las imágenes de los cultivos celulares se empleó un microscopio invertido Olympus IX-71, y las fotos se realizaron en campo claro con el objetivo 10X. Para las imágenes de confocal se utilizó un microscopio confocal fluorescente espectral Leica TCS-SP2-AOBS.

## 1.8 Cuantificaciones celulares y cuantificación del área de expresión

Las cuantificaciones celulares en las imágenes fluorescentes se llevaron a cabo con ayuda del *plugin* “Cell counter” del software ImageJ (NIH).

La expresión del marcador CD31 en rodajas de CC proporciona una tinción filamentosa y sinuosa, que forma una red por todo el tejido difícil de cuantificar. Por consiguiente, para el análisis de este marcador, utilizamos su área de expresión. Usando de nuevo ImageJ, se elaboró una macro para esta tinción que modificaba, en cada imagen, el brillo/contraste, la transformaba a imagen de 8 bits, y le asignaba un valor umbral (*threshold*), definido visualmente, para delimitar los píxeles positivos. De ese modo, se obtenía una imagen máscara de la tinción original que se basaba en adjudicar 1 o 0 a cada pixel, siendo 1 expresión del marcador y 0 no expresión. Con estas imágenes binarizadas podíamos analizar dónde se expresaba el marcador, aunque no el nivel de expresión. Posteriormente, se medía el área de esta expresión en la rodaja de CC de cada imagen. El área total de CC se establecía utilizando el marcaje DAPI, ya que el parénquima del CC puede definirse fácilmente por la densidad de núcleos que lo forman. Estas medidas pueden extrapolarse al órgano completo.

La estimación del volumen completo del CC se basó en el “principio de Cavalieri” (Cavalieri, 1966), según el cual el volumen de un objeto puede ser estimado a partir de secciones paralelas separadas por una distancia conocida. De este modo, conociendo la distancia de separación entre secciones y el área de cada sección, se puede calcular el volumen total del órgano. Se calculó el volumen de cada rodaja mediante la fórmula *área por altura*, siendo la altura el grosor de la rodaja (10  $\mu\text{m}$ ). Como se mencionó en el apartado 1.5.2, el CC se cortó de forma seriada. Esto hace que en un mismo portaobjetos, entre una y otra rodaja haya tantas rodajas intermedias como portas hayamos utilizado para recoger el tejido. Para calcular el volumen de las rodajas intermedias, el CC se trató como una esfera y se aplicó la siguiente fórmula:  $(\text{rod}_{-1} + \text{rod}_1)/2$ . El volumen total del CC se obtuvo sumando el volumen de todas las rodajas, las que se han analizado directamente y las rodajas intermedias en las que se ha calculado su volumen supuesto.

## 2 Estudios in vitro

### 2.1 Medios y soluciones

Todas las soluciones se prepararon en condiciones de esterilidad y se mantuvieron a 4 °C. Los medios de cultivo no se usaron con más de 2 semanas.

- **Solución de extracción:** Tyrode  $2\text{Ca}^{+2}$   $1\text{Mg}^{+2}$ : NaCl 140 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1mM, HEPES 10 mM, glucosa 5mM y piruvato sódico 5mM (Sigma), pH = 7,4.
- **Medio de dispersión:** 1 ml de PBS con 0.6 mg de colagenasa II (Sigma), 0.3 mg de tripsina (Sigma), 7.5  $\mu\text{l}$  de elastasa porcina (Calbiochem), y 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  de una solución stock 5mM.
- **Medio completo:** DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagles Medium/F12; (GIBCO) suplementado con FBS al 15% (GIBCO), N2 al 1% (GIBCO), B27 al 2% (GIBCO), penicilina/estreptomicina (P/S) al 1% (GIBCO), 20 ng/ml de FGF2 (factor de crecimiento fibroblástico básico (R&D Systems)), 20 ng/ml de EGF (factor de crecimiento epidérmico (R&D Systems)) y 20 ng/ml de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico (R&D Systems)).
- **Medio de diferenciación:** DMEM/F12 suplementado con FBS al 15%, N2 al 1%, B27 al 2%, y P/S al 1%.
- **Medio de proliferación:** DMEM/F12 suplementado con FBS al 15%, N2 al 1%, B27 al 2%, P/S al 1%, Endotelina-1 a 0,01  $\mu\text{M}$  (Sigma), 20 ng/ml de FGF2, 20 ng/ml de EGF y 20 ng/ml de IGF-1.
- **FACS o medio de neutralización:** para 50 ml: 44 ml de medio L15 (GIBCO), 0.5 ml de P/S (GIBCO), 0.5 ml de HEPES 1 M (GIBCO), 0.1 g de BSA (Sigma), y 5 ml de agua destilada y desionizada.

## 2.2 Disección y dispersión de tejidos

Para los cultivos de células de CC se utilizaron ratas jóvenes adultas de ambos sexos de entre 20 y 35 días de edad. Las ratas fueron anestesiadas y preparadas para la cirugía de extracción de ambas bifurcaciones carótideas. Las bifurcaciones se depositaron sobre una placa de Petri con *solución de extracción* y se mantuvieron en hielo. El fondo de estas placas estaba recubierto de Sylgard (Dow Corning Corporation), lo que permitía el manejo de los tejidos para su limpieza y facilitaba la disección de los CC. El fondo de la placa estaba pintado de negro para permitir una mejor visualización de los tejidos a la lupa (Olympus SZX10). Para la disección de los CC se utilizaron pinzas y tijeras de iridectomía (World Precision Instruments). Cuando los CC se extraían de las bifurcaciones, se pasaban a una placa similar de menor tamaño donde se terminaban de limpiar de restos de tejidos graso y conectivo. De cada CC de rata se pueden extraer entre 20.000 y 30.000 células, por lo que el número de animales utilizados dependió del número de células que necesitábamos para los cultivos. En los estudios realizados se intentaron utilizar al menos 2 animales por condición para minimizar la variabilidad entre individuos. Los CC se incubaron en *solución de dispersión*. Se preparaba 1ml por cada 2 CC y se dispersaban a la vez un máximo de 6 CC. La dispersión se realizó en botes de centelleo que se colocaban en un termoagitador (Eppendorf) a 37 °C y 550 rpm durante 15 minutos. Después de ese tiempo, con una punta azul (P1000) previamente sumergida en suero, se pipeteó la muestra arriba y abajo, con suavidad y evitando producir burbujas que dañasen a las células por tensión superficial. Si era necesario, se volvía a incubar la muestra otros 5 min en el termoagitador, hasta la total dispersión de los CC. Las células se pasaban entonces a un tubo de 15 ml que se rellenaba con 2 volúmenes de *solución de neutralización* y se centrifugaba a 300 g 5 min y a 4°C. Después, se descartaba el sobrenadante hasta dejar 100-500  $\mu\text{l}$  de solución, que tras la resuspensión celular se repartía en las placas de cultivo. Los CC procedentes de ratón se diseccionaban y dispersaban siguiendo el mismo protocolo.

## 2.3 Cultivo de células madre del cuerpo carotídeo en condiciones de no adherencia: ensayo de neuroesferas

Las células obtenidas tras la dispersión eran sembradas en placas de cultivo de seis pocillos (Ultra low binding Plate, Costar (Corning)). Estas placas están especialmente fabricadas para el cultivo en suspensión y llevan un tratamiento que evita que las células se adhieran al sustrato. Tradicionalmente, para el cultivo de neuroesferas del SNP se ha utilizado un medio químicamente definido suplementado con extracto de embrión de pollo y los mitógenos FGF-2 e IGF-1 (Stemple and Anderson, 1992; Morrison et al., 1999). En este estudio se utilizó un medio modificado a partir de éste en el que se ha sustituido el extracto de embrión de pollo por FBS y al que se le ha añadido el mitógeno EGF. A este medio lo hemos llamado *medio completo* (ver sección 2.1 de “*Materiales y Métodos*”). Cada pocillo se cubría con 2 ml de medio de cultivo completo, de proliferación o de diferenciación, y se dejaban equilibrar las placas en el incubador antes de sembrar las células. Las células se sembraron a densidad de 10.000 células por pocillo para evitar agregación y permitir el crecimiento clonal de las CMCC formadoras de neuroesferas. Las placas se incubaron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 7 o 10 días, según el experimento. Con ese número de células sembradas y ese tiempo en cultivo, no era necesario cambiar el medio. El incubador (8000 WJ, Thermo Scientific) se mantenía al 21%, 3% o 1% de O<sub>2</sub>, según el experimento. Pasado el tiempo de cultivo, las neuroesferas se fotografiaron con un microscopio invertido Olympus IX-71 y se procesaron de acuerdo a los objetivos de cada experimento.

Para el estudio del efecto de la ET-1 sobre las neuroesferas de CC, el factor fue reconstituido en agua ultrapura a una concentración de 10 µg/ml y añadido cada dos días al cultivo. El factor reconstituido fue congelado y mantenido a -20°C, hasta un mes, en pequeñas alícuotas. El PD145065 (Sigma), un antagonista de los receptores A y B de ET-1, fue reconstituido en agua ultrapura a 0,5 mg/ml y añadido 30 minutos antes que la ET-1. La preparación del resto de factores estudiados durante esta tesis se detalla más adelante en el *Capítulo de Resultados*.

## 2.4 Técnicas inmunofluorescentes

### 2.4.1 Inmunofluorescencia en secciones de neuroesferas

Las neuroesferas se recogieron de las placas de cultivo, se incluyeron en OCT, se congelaron, y posteriormente se cortaron al criostato (secciones de 10 µm). Para ello, se concentraban mediante movimientos circulares en el centro del pocillo, y se recogían con una pipeta P200 con la punta previamente mojada en medio con suero. Se intentó coger sólo las neuroesferas evitando recolectar las células sueltas que quedaban en el pocillo. Las neuroesferas fueron traspasadas a otra placa con PBS donde se lavaron del medio de cultivo, y seguidamente, se volvieron a recoger, esta vez con una punta P20 y en el volumen más pequeño posible (8-10 µl). De esta manera se incluyeron en OCT en moldes de tamaño intermedio. Con el molde bajo la lupa, las neuroesferas se colocaron en la mitad aproximadamente del bloque, lo más agrupadas posible, para facilitar su posterior corte. Se hizo una pequeña marca en el molde con un rotulador para determinar dónde comenzaban a aparecer las neuroesferas. Los moldes se congelaron sobre nieve carbónica y se guardaron a -80 °C. Los bloques se seccionaron como se describe en apartado 1.5.2 y 1.5.3. Al tratarse de tejido sin fijar, los portaobjetos con las secciones se guardaron a -80 °C. Para el marcaje con anticuerpos, las rodajas se fijaron previamente con acetona como se describe en el apartado 1.5.3,

y se procedió del mismo modo que para las rodajas de CC (ver apartado 1.6 de “Materiales y Métodos”).

## **2.4.2 Inmunofluorescencia de células dispersas de cuerpo carotídeo**

Las células dispersas se dejaban adherir sobre cubreobjetos de cristal previamente tratados con Poli-D-Lisina (Sigma) en placas de 4 o 24 pocillos. Para fijar las células se añadió 500 µl de PFA a cada pocillo durante 15 min a RT. Después, se retiró el PFA y se lavó 2 veces con PBS durante 5 min. Las células podían almacenarse en este paso. Para ello se dejaban en PBS con acida sódica al 0,01%, se sellaba la placa con parafilm y se mantenían a 4°C. Para continuar con la inmunofluorescencia, las células se lavaron 2 veces con PBS-Igepal al 0,01% (Sigma) durante 5 min. El Igepal es un detergente suave, sustitutivo del NP-40, que se usa para permeabilizar las células y minimizar la tensión superficial. A partir de aquí, todos los lavados e incubaciones se realizaron en agitación suave mediante un agitador orbital. A continuación, las células se incubaron con solución de bloqueo para células (suero de cabra al 4%, BSA al 0,4%, Igepal al 0,1%, acida al 0,01%, en PBS) al menos 1h a RT, para impedir uniones inespecíficas, y seguidamente se incubaron con los anticuerpos primarios. Los anticuerpos frente a Ki67 se incubaron solos, ya que habíamos detectado reacción con otros anticuerpos. El tiempo de incubación varió desde los 30-60 minutos a RT que usábamos con los anticuerpos anti-Ki67, hasta toda la noche a 4°C, condición que se utilizó para el resto de anticuerpos. Los anticuerpos primarios se lavaron varias veces con PBS-Igepal, tras lo cual se procedió con la incubación con anticuerpos secundarios fluorescentes durante 1h a RT y protegidos de la luz. Es conveniente hacer notar que los lavados y el bloqueo se realizaron con un volumen de 500 µl/pocillo. Sin embargo, la incubación con los anticuerpos se realizó con un volumen de 150 µl/pocillo para ahorrar anticuerpo. Seguidamente, las células se lavaron de nuevo y se incubaron con DAPI durante 10 min para el marcaje de los núcleos. Por último, sin necesidad de lavar el DAPI, los cubreobjetos con las células fueron retirados con la ayuda de una aguja de punta curva y una pinza y depositados bocabajo sobre un portaobjetos al que se le colocó una pequeña gota de medio de montaje para fluorescencia (Dako). Cuando el medio de montaje estaba seco, se procedía a la observación mediante un microscopio Olympus BX-61, o se guardaban los portaobjetos a 4 °C para su posterior análisis.

## **2.5 Ensayos funcionales en cultivos de células madre del cuerpo carotídeo**

### **2.5.1 Determinación de la capacidad proliferativa de las células madre del cuerpo carotídeo; medida del diámetro de las neuroesferas**

La medida del diámetro de una neuroesfera proporciona información sobre la capacidad proliferativa de las células progenitoras que la forman. Para el estudio del efecto de los factores en cultivo, analizamos los diámetros de las neuroesferas de cada condición. Normalmente, cada condición contaba con aproximadamente 3 réplicas (un mínimo de 2 y un máximo de 6 réplicas por condición). Cada réplica correspondía a un pocillo de la placa de cultivo. Se medía el diámetro medio de las neuroesferas en cada pocillo y con ellos se extraía una media de las réplicas. Esta media poblacional era comparada entre las distintas condiciones del experimento. En cada pocillo había entre 40 y 50 neuroesferas, aproximadamente, por lo que las comparaciones entre condiciones se hacían, al menos, con la medida de 150

neuroesferas (Ohtsuka et al., 2001). La medida de los diámetros se hacía de forma manual con la ayuda del software ImageJ (NIH).

### 2.5.2 Análisis de la diferenciación de las células madre del cuerpo carotídeo

En las neuroesferas de CC las células diferenciadas dopaminérgicas se distribuyen en el exterior formando unas estructuras abultadas llamadas *blebs*. Los progenitores se distribuyen, por el contrario, por todo el interior de la esfera, pudiéndose hablar de una zona diferenciada y otra zona indiferenciada que prácticamente nunca solapan. Para estudiar el efecto de un factor sobre la diferenciación de los progenitores de CC hemos utilizado la medida de ambas áreas delimitadas por la expresión de Tirosina hidroxilasa, en caso de la zona diferenciada, y Nestina, en caso de la zona indiferenciada. Las neuroesferas fueron preparadas y teñidas como se detalla en la sección 2.4.1 y se tomaron fotos de fluorescencia de las rodajas de neuroesferas con un objetivo 20x. En el canal verde se tomaron las imágenes para la tinción de Nestina, en el canal rojo para TH, y en el canal azul para DAPI. Con la ayuda del software ImageJ, se elaboró un macro para cada canal, tal y como se explica en la sección 1.8 para el marcador CD31. De esta forma, se midió el área de cada tinción en cada imagen. Posteriormente, se sumaron las áreas de todas las rodajas, obteniéndose un único valor de área de tinción de cada marcador para todo el cultivo. Este valor se referenció al área total que ocupaban todas las rodajas analizadas. El área total se obtenía de la imagen con los tres canales juntos. Con este método se analizó el grado de diferenciación inducido por un agente o factor sobre el cultivo de neuroesferas.

## 3 Citometría de flujo

La citometría de flujo se utilizó para analizar y obtener poblaciones celulares purificadas de interés. Las separaciones celulares se realizaron mediante la técnica *FACS* (*fluorescent activated cell sorting*) usando un citómetro de flujo de tres láseres MoFlo (DAKO Cytomation). Esta técnica aprovecha la fluorescencia desprendida por un fluoróforo, unido en nuestro caso a un anticuerpo secundario, para identificar un tipo celular concreto y separarlo de la mezcla heterogénea de células. Para el *FACS* se utilizaron dos tipos de muestras, células dispersas a partir de cuerpos carotídeos completos, y células procedentes de la dispersión de neuroesferas. Las células muertas fueron eliminadas del análisis mediante el marcador de viabilidad 7-AAD (Molecular Probes), para el cual son positivas. Para estos experimentos es imprescindible llevar tubos control que sirven también para los ajustes del citómetro. Uno de estos tubos control debe llevar células incubadas con los anticuerpos secundarios, para poder eliminar la fluorescencia inespecífica de éstos, y el otro tubo control lleva las células marcadas con 7-AAD, para establecer los valores negativos de este fluoróforo sin otra interferencia. Antes de pasarlas por el citómetro, todas las muestras se filtraron con membranas de 50 µm de poro (Celltrics, Partec) para eliminar los grumos y agrupaciones celulares.

### 3.1 Separación de células de cuerpo carotídeo por FACS

Los CC (12-16 CC) se dispersaron como se describe en la sección 2.2 y las células se conservaron en hielo durante todo el proceso de tinción. Estas dispersiones se utilizaron para separar células HNK-1 positivas y CD31 positivas de CC de rata, y células GFP+ procedentes de ratones TH-EGFP. Se observó que



las células endoteliales CD31+ eran muy sensibles al proceso de dispersión al que eran sometidos los CC, y que la expresión de CD31 aumentaba drásticamente (de 2-5% a 20-25% de células positivas del total) si las células se cultivaban durante 12 horas en condiciones no adherentes, antes de comenzar la tinción previa al citómetro. La expresión de HNK-1 no se modificó tras las 12 horas en cultivo y rondó el 10% de células positivas. La cantidad de células recolectadas difirió entre experimentos, aunque de ambas poblaciones se obtenían aproximadamente entre 300 y 500 células positivas por CC. La tinción para HNK-1 está muy bien puesta a punto en el grupo (Pardal et al., 2007), y la utilizamos, además de para obtener células positivas, como control de todo el proceso. Las células dispersas se transfirieron de los tubos de 15 ml a los tubos específicos de citometría. Se lavaron con 3 ml aproximadamente de *solución FACS* (ver Soluciones en apartado 2.1) y se centrifugaron a 300g durante 5 min y a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en los anticuerpos primarios diluidos en *solución FACS*. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante 20 min en hielo, tras los cuales se lavaron con 3 ml de *FACS*. A continuación, se incubaron las células con los anticuerpos secundarios, FITC-goat-anti-mouse-IgM para HNK-1 y PE-rat-anti-mouse-IgG<sub>1</sub> para CD31, diluidos 1:200 en *FACS*, durante 20 min, en hielo y oscuridad. Se volvió a lavar con *FACS* y a centrifugar. Por último, las células se resuspendieron en el marcador de viabilidad 7AAD diluido 1:500 en *FACS*. Para Adora2a (A2a) se procedió del mismo modo que para los anticuerpos anteriores utilizándose FITC-goat-anti-mouse para su visualización. Las células GFP poseen fluorescencia endógena por lo que no son necesarios los pasos de tinción, excepto aquél destinado a marcar la viabilidad con 7AAD.

### 3.2 Separación de células de neuroesferas por FACS

El estudio de la expresión de CD31, HNK-1 y CD74 en neuroesferas y la separación de dichas poblaciones celulares se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Para ello, las neuroesferas se dispersaron con StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent (Life Technologies) durante 15-20 min a RT. Posteriormente, las neuroesferas se pipetearon suavemente y se neutralizó las enzimas con *solución de neutralización*. Finalmente, las células se centrifugaron a 300g, 5 min a 4°C. A partir de este paso, la tinción y todo el proceso se realizó del mismo modo que en el apartado 3.1. El anticuerpo HNK-1 fue detectado normalmente mediante FITC-goat-anti-mouse-IgM. CD31 y CD74 fueron detectados con PE-rat-anti-mouse-IgG<sub>1</sub>.

## 4 Análisis de expresión de ARN mensajeros

### 4.1 Extracción de ARN total y retrotranscripción

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante la extracción de ARN total desde CC, neuroesferas o células separadas por citometría. La cantidad de material dependió del experimento y del tipo de muestra. La extracción de ARN se realizó con el kit comercial RNeasy MICRO kit (Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las medidas de concentración del ARN obtenido se llevaron a cabo en un Nano Drop 2000 (Thermo Scientific). El ADNc se sintetizó mediante el kit QuantiTec Reverse transcription kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El proceso de retrotranscripción se llevó a cabo a 42°C durante 30 min. El tratamiento inicial de los tejidos fue diferente según los casos:



- **Cuerpos carotídeos.** Se usaron de 8 a 10 órganos. Éstos fueron extraídos en condiciones libres de ARNsas. El material necesario para la cirugía y recolección se trató con RNaseZap (Ambion) o fue horneado a 240 °C durante 4 horas. Se usaron soluciones tratadas con Dietilpicrocarbonato (DEPC Sigma). Los CC se recolectaron en un tubo de microcentrífuga libre de ARNsas, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C. Posteriormente, para la ruptura de los tejidos se usó arena de sílice (Sigma) que también fue horneada. Se añadió un poco de arena a los tubos de microcentrífuga, que se mantuvieron en nitrógeno líquido durante el proceso, y con ayuda de un pistilo desechable se presionó el tejido para romperlo. Seguidamente, se retiró el tubo del nitrógeno y se añadió 350 µl de solución de lisis RLT (Qiagen). Se decantó la arena mediante un pulso con la microcentrífuga (Eppendorf) y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo. El sobrenadante fue entonces homogeneizado con una aguja de 20G acoplada a una jeringuilla de 1 ml. Posteriormente, se volvió a centrifugar para retirar restos de tejido. A partir de aquí, se siguieron las instrucciones del kit de extracción de ARN.
- **Neuroesferas.** Se intentó partir de, al menos, 2 pocillos de cultivo con neuroesferas. Las neuroesferas eran recolectadas bajo el microscopio con especial cuidado de no introducir células sueltas u otro material presente en el medio. Se pasaron a un tubo de microcentrífuga donde fueron centrifugadas a 300 g, durante 5 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y los tubos se congelaron en nitrógeno líquido. El proceso posterior de extracción de ARN fue el mismo que para los CC.
- **Células provenientes del citómetro.** Se usaron un mínimo de 1.000-2.000 células y el máximo dependió del rendimiento del proceso de separación, que nunca fue más de 7.000 células. Las células se separaron directamente sobre solución de lisis RLT (Qiagen), se vortexearon, se centrifugaron a máxima potencia, y se guardaron a -80 °C para la posterior extracción de ARN, la cual se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante.

## 4.2 Reacciones de PCR

**Las reacciones de PCR estándar** se realizaron en un termociclador Professional TRIO (Biometra). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía tampón  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{MgCl}_2$  a 2mM, dNTPs (Invitrogen) a 0,2 mM, cebadores a 0,4 µM (Sigma), 5 U de Taq polimerasa (Bioline) y 1 µl de muestra. Las condiciones de las reacciones fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 40 ciclos a la temperatura de alineamiento específica de cada pareja de cebadores, y una extensión final a 72 °C de 5 min. Se realizó una electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE, National Diagnostic) de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,5% en TBE, con 10 µg/ml de bromuro de etidio y tampón de carga 10X (Takara), para determinar el tamaño de las bandas de cada transcrito. La información sobre los genes analizados y los cebadores se facilita en la Tabla 4.

**Las reacciones de PCR cuantitativas** (qRT-PCR, Real Time quantitative Reverse Transcription PCR) se realizaron en un termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System en las condiciones recomendadas por el fabricante (Applied-Biosystems). La detección se realizó con SYBR Green PCR Master Mix o ensayos TaqMan (Applied-Biosystems), dependiendo del experimento. Cada muestra se normalizó respecto al transcrito ribosómico de 18S (en los ensayos con

SYBR Green) o respecto a Hprt1 (en los ensayos con TaqMan), para realizar la cuantificación relativa de su expresión génica. Las curvas de disociación de los genes mostraron un único pico, demostrando así la especificidad de los cebadores. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el método de  $\Delta\Delta C_t$ . El ADNc de las muestras se diluyó en agua ultrapura, a 1/5 para neuroesferas y CC, y 1/2 para células provenientes de la separación por FACS, y de esa dilución se usaron 4  $\mu$ l de muestra por pocillo en placas de 96 pocillos (MicroAmp Fast Optical, Applied-Biosystems). Estas placas se mantuvieron en hielo durante todo el proceso, se sellaron con film (Optical Adhesive Film, Applied-Biosystems), y se centrifugaron antes de su análisis.

### 4.3 Transfecciones de células dispersas de cuerpo carotídeo con ARNi

Las células dispersas de CC se transfectaron tras 8 ó 12 horas en cultivo mediante el producto *SMARTpool siRNA* de Dharmacon. Se utilizaron ensayos frente a ET-RA (siET-RA) o ET-RB (siET-RB), y un ensayo control (siControl). Estos ensayos contienen 4 secuencias de ARN de interferencia (ARNi) distintas para asegurar la interferencia del gen. Las células dispersas se sembraban primero en medio completo, el cual contiene P/S para evitar la contaminación inicial. Tras las 8-12 horas, se recogieron las células y se pasaron a medio completo (con suero) sin antibióticos, ya que éstos pueden dañar a las células debido a los poros que se abren en las membranas. Para la transfección se usó *Lipofectamina2000* (Life-Technologies-Invitrogen). Tras 24 horas, se cambiaron las células de nuevo a medio completo con P/S para eliminar los ARNi y la lipofectamina del medio de cultivo. Se realizó una curva de dosis/respuesta de ARNi para cada gen, obteniéndose una dosis óptima de 50 nM. Hay que tener en cuenta que 50 nM es la concentración total de ARNi con la que se transfecta. En esta cantidad van las 4 secuencias de interferencia, por lo tanto de cada secuencia hay 12,5 nM. Se realizó también un curso temporal para comprobar el tiempo que duraba la interferencia. Las células se cultivaban durante 7 días para que formaran neuroesferas, en presencia o ausencia de ET-1. Este factor se añadía una sola vez durante el cultivo, 64 horas tras la transfección. La bajada en la expresión de los genes se detectó 48 horas después de la transfección por qRT-PCR mediante ensayos TaqMan.

## 5 Análisis de microarrays

### 5.1 Cultivos de neuroesferas para microarray

Los estudios de expresión génica se realizaron a partir de cultivos de neuroesferas de CC, y pretendían comparar la expresión diferencial de genes entre neuroesferas diferenciadas (NSdiff) y neuroesferas indiferenciadas (NSundiff). Estas dos poblaciones se obtuvieron al cultivar las células dispersas procedentes de CC en dos tipos de condiciones. Para la obtención de cultivos de NSundiff, las células se cultivaron en *medio de proliferación*, el cual contiene ET-1 y 21% de O<sub>2</sub>. Para la obtención de NSdiff, neuroesferas enriquecidas en células dopaminérgicas, éstas se cultivaron al 3% de O<sub>2</sub> en *medio de diferenciación* (ver sección 2.1 de “*Materiales y Métodos*”). En ambos protocolos las células se cultivaron durante 13 días.

## 5.2 Estudio de expresión diferencial de genes

El análisis de expresión se realizó mediante microarrays GeneChip® Rat Gene ST 1.0 Array de Affymetrix en la Unidad de Genómica del *Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa* (CABIMER). Se analizaron un número estimado de 27342 genes bien descritos y conocidos. El análisis estadístico de los datos, que fue llevado a cabo también por la misma unidad de Genómica, se realizó por LIMMA (Linear Models for Microarray Analysis) utilizando el programa oneChannel (en R), que es el recomendado para esta plataforma. Se trata de un análisis que aplica un t-test empíricamente ajustado por un test de Bayes.

## 5.3 Validación de los microarrays

Los datos obtenidos del análisis de los microarrays fueron validados por qRT-PCR mediante el uso de placas prediseñadas conteniendo sondas TaqMan (Applied Biosystem) de un grupo de genes de interés. Estas placas contenían 44 ensayos en duplicado que incluían un control genérico (18S ARN) y tres genes de control endógeno (GAPDH, HRTF1 y GUSB). Los pocillos de estas placas se rellenaron con 20 µl de muestra obtenidos a partir de la disolución del ADNc procedente de la retrotranscripción de cada cultivo, diluidos 1/14 en agua ultrapura, y se añadió un volumen de *Taq Man Fast Master Mix*.

## 5.4 Estudio de las funciones biológicas mediante IPA

Los datos de expresión génica de los microarrays se han analizado mediante el programa Ingenuity Pathways Analysis (IPA) de Ingenuity System. Este programa ayuda a interpretar el significado biológico de los datos genómicos. IPA utiliza la *Ingenuity Knowledge Base*, una base de datos creada manualmente por expertos basada en la literatura científica, que es revisada y actualizada continuamente. Para proporcionar los resultados, IPA emplea dos estadísticos, el z-score y la p-value. La *p-value* es calculada mediante el *Test exacto de Fisher* y refleja la probabilidad de que la asociación o la superposición entre un conjunto de moléculas importantes del experimento y un proceso dado se deban al azar. Cuanto menor es el valor de p, menor será la probabilidad de que la asociación sea debida al azar. El valor p no tiene en cuenta el efecto direccional de la expresión de una molécula, es decir si un gen está sobreexpresado o infraexpresado. El z-score tiene en cuenta el efecto direccional de una molécula sobre otra molécula o en un proceso, y la dirección del cambio de las moléculas en el conjunto de datos.

Para este estudio, los genes proporcionados por los microarrays fueron seleccionados aplicando un FCH $\geq$ 2 y una FDR (*p-value* ajustado) $<0,01$ , y se llevó a cabo un *IPA Core Analysis*. Este análisis ofrece una evaluación de la señalización y rutas metabólicas, redes moleculares y procesos biológicos que están significativamente representados en el conjunto de datos. Los procesos biológicos se definen como *Categorías* y *Biofunciones*. Las *Categorías* agrupan *Biofunciones* más específicas. Una *Biofunción* puede estar contenida en una o varias *categorías*, por lo que para evitar la redundancia se ha mencionado cada *Biofunción* una sola vez incluyéndose en la *Categoría* que se pensó más conveniente, teniendo en cuenta su orden de aparición o especificidad.

## 6 Análisis estadístico

Los datos estadísticos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). La significación estadística se estimó mediante la *prueba t de Student (Test-T)*. Para el análisis de las muestras obtenidas de cultivos celulares se utilizó el Test-T para dos muestras pareadas, y para los experimentos con animales, el Test-T para dos muestras independientes. En el caso de la cuantificación de vesículas de núcleo denso en los experimentos de microscopía electrónica, la significación estadística se calculó por ANOVA y por pruebas post-hoc de Bonferroni, utilizando el software SPSS.

## 7 Anexos

### 7.1 Anticuerpos utilizados

Abreviaturas:

PE: Phycoerythrin

FITC: Fluorescein isothiocyanate

P: policlonal

**Tabla 2. Anticuerpos primarios.**

Antígeno	Origen/tipo	Dilución	Compañía	Referencia
A2a (7F6-G5-A2)	Raton/IgG2	1:200	Millipore	05-717
BrdU [BU1/75 (ICR1)]	Rata/IgG2a	1:200	Abcam	ab6326
CD31 (TLD-3A12)	Raton/IgG1	1:200	BD Pharmigen	555025
CD74 (MRC OX3)	Raton/IgG1	1:200	Abcam	ab22348
ET-RA	Conejo/p	1:200	Chemicon	AB 3260
ET-RB	Conejo /p	1:200	Chemicon	AB 3284
GFAP	Conejo/p	1:500	Dako	Z-0334
GFAP (GA5)	Raton/IgG1	1:300	Cell Signalling	3670
HNK-1	Raton/IgM	1:500	BD Bioscience	559048
Ki67 (SP6)	Conejo/IgG	1:200	Thermo Scientific	RM-9106
Ki67 (B56)	Raton/IgG1	1:200	BD Pharmigen	550609
Nestina (rat-401)	Raton/IgG1	1:400	Millipore	MAB 353
TH	Conejo/p	1:1000	Novus Biological	NB300-109
TH (TH-2)	Raton/IgG1	1:500	Sigma	T-1299

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios.**

Antígeno	Frente a	Dilución	Compañía	Referencia
Alexa Fluor 488 anti-IgG	Ratón	1:500	Molecular Probes	A-21202
Alexa Fluor 488 anti-IgG	Conejo	1:500	Molecular Probes	A-21206
Alexa Fluor 568 anti-IgG	Ratón	1:500	Molecular Probes	A-11004
Alexa Fluor 568 anti-IgG	Conejo	1:500	Molecular Probes	A-11036
PE anti-IgG	Ratón	1:200	BD Pharmigen	550083
FITC anti-IgG	Rata	1:200	Jackson IR Labs	712-096-150
FITC anti-IgM	Ratón	1:200	Jackson IR Labs	115-096-075

## 7.2 Secuencias y condiciones de cebadores utilizados

Abreviaturas:

S: cebador sentido

A: cebador antisentido

r: rata

m: ratón

**Tabla 4. Cebadores para PCR.**

ARNm		Secuencia (5'→3')	T (°C)	Amplicon	Referencia/ Software
Standard PCR					
Edn1 (r-m)	S	ATCATCTGGGTCAACACTC	50	727	Kugelmeier et al., 2008
	A	GAATCTCCTGGCTCTCTG			
ET <sub>A</sub> (r)	S	TTCGTCATGGTACCCTTCGA	56	546	Kugelmeier et al., 2008
	A	GATACTCGTTCCATTTCATGG			
ET <sub>B</sub> (r)	S	TTCACCTCAGCAGGATTCTG	57	474	Kugelmeier et al., 2008
	A	AGGTGTGGAAGTTAGAACG			
Cdh5 (r)	S	GCACAGGCGGGTGTGAGCAT	58	340	Pimer Blast (NCBI)
	A	TCTCTCTGGGCCCTCCGTGC			
TH (r)	S	GGACATTGGACTTGCATCTCTGGG	58	600	Primer Express
	A	TGAGAAGCAGTGTTGGGAGGATGG			
TH (m)	S	TGGAGGCTGTGGTATTTCG	59	421	Primer Express
	A	TCTGCAATCAGCTTCCGG			
β-Actin (m)	S	TGTGATGGTGGGAATGGG	59	441	Primer Express
	A	AGGTAGTCTGTCAGGTCC			
Real-time PCR					
Edn1 (r)		desconocida			Qiagen
TH (r)	S	TCGGAAGCTGATTGCAGAGA			Primer Express
	A	TTCCGCTGTGTATTCCACATG			
Nestin (r)	S	TCCCACAAGGCTGTTCTGG			Primer Express
	A	TTGTGCAGGTGGTAGGCAAG			
Vegf (r)	S	CGCAAGAAATCCCGGTTTAA			Primer Express
	A	CAAATGCTTTCTCCGCTCTGA			
c-myc (r)		desconocida			Qiagen

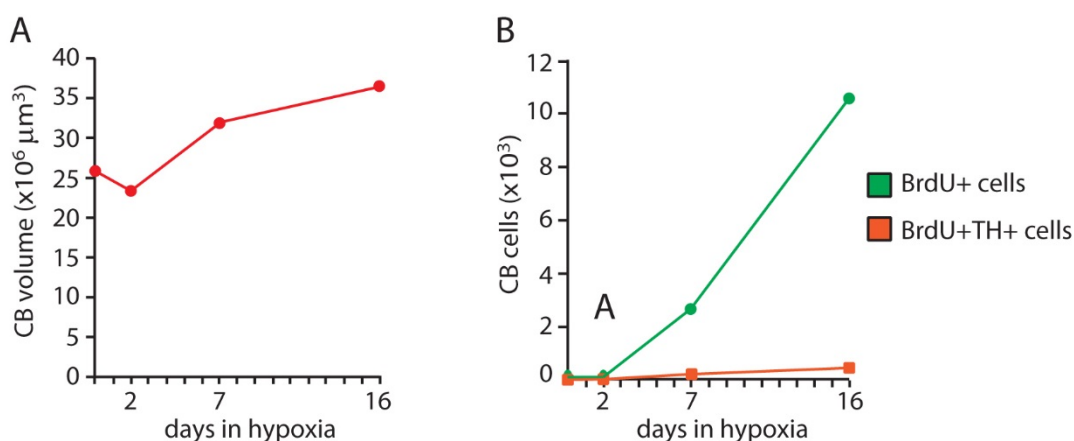


# RESULTADOS

## 1 Crecimiento del cuerpo carotídeo de rata en hipoxia crónica

El cuerpo carotídeo (CC) de mamíferos sufre hipertrofia celular en respuesta a una situación de hipoxemia mantenida. Esta hipertrofia afecta al órgano en su conjunto. El parénquima neurosecretor, representado por la región que ocupan los glomérulos de células glómicas, experimenta un incremento importante. También aumenta el parénquima vascular, por vasodilatación y formación de nuevos vasos, y el tejido conectivo, formado por fibras y distintas células como fibroblastos y macrófagos. En nuestro grupo de investigación se ha descrito previamente el crecimiento del parénquima neurosecretor del CC de ratón en condiciones de hipoxia crónica (Pardal et al., 2007). Como paso previo a los estudios presentados en esta tesis doctoral, se decidió analizar el crecimiento del CC en ratas Wistar, ya que la mayoría de los experimentos posteriores se realizarán con esta especie de roedor, cuyos CC son más grandes y manipulables que los de ratón.

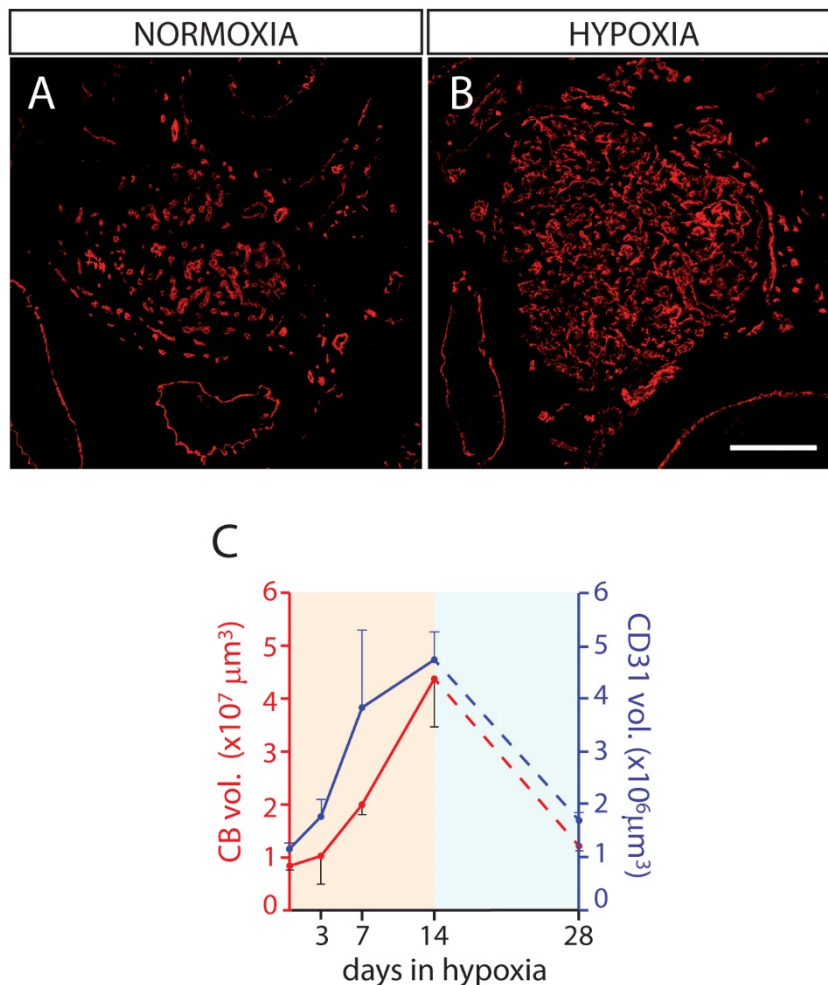
Como puede observarse en la figura 15 A, el tamaño del CC de rata adulta incrementa gradualmente durante los días de exposición a hipoxia. En el panel B se muestra la cuantificación de proliferación en el órgano analizada mediante la captación de BrdU. El BrdU fue administrado mediante una inyección intraperitoneal semanal y en el agua de bebida, durante todo el experimento. Nótese que las células BrdU+ aparecen desde los primeros días y aumentan rápidamente en número, sobre todo, a partir de la primera semana de tratamiento. Sin embargo, debido a que las nuevas células glómicas aparecen alrededor del quinto o sexto día, las células dobles positivas para BrdU y TH comienzan a aparecer a partir del séptimo día, aumentando progresivamente hasta el final del tratamiento. Este experimento muestra que, de forma general, el crecimiento y la proliferación del CC de rata siguen una dinámica similar a la encontrada en el CC de ratón (Pardal et al., 2007).



**Figura 15. Cuantificación del volumen y el número de células del cuerpo carotídeo de ratas expuestas a hipoxia.** **A** Animales sometidos a hipoxia (10%  $\text{O}_2$ ) durante 2, 7 y 16 días. Se utilizaron sólo dos roedores por grupo, ya que este estudio sólo aspiraba a corroborar la dinámica de crecimiento observada anteriormente en ratón. El volumen de los CC aumenta progresivamente durante los días de exposición a hipoxia. **B** Las células comienzan a proliferar entre los días 2 y 7 de exposición a hipoxia y su número aumenta drásticamente a lo largo del tratamiento. Las células

dobles positivas, BrdU/TH, aumentan más lentamente y es a partir del día 7 cuando se observa el mayor incremento.

Para estudiar el proceso angiogénico que acompaña al aumento del parénquima neurosecretor del CC, se analizó el incremento de la vasculatura mediante el uso del marcador endotelial vascular CD31. Las figuras 16 A y 16 B muestran la expresión de CD31 en el CC de ratas tras 14 días de hipoxia. En el gráfico 16 C aparece la cuantificación del volumen completo de los CC y el volumen ocupado por el marcador CD31 (ver apartado 1.8 de “*Materiales y Métodos*”), en los distintos grupos de animales. La expresión de CD31 incrementó de forma continuada hasta los 14 días de hipoxia. En cuanto al periodo de renormoxia (vuelta a la situación de normoxia tras un periodo de hipoxia), las células endoteliales siguieron la misma dinámica que el parénquima neural, volviendo la superficie ocupada por células CD31+ a los valores iniciales.



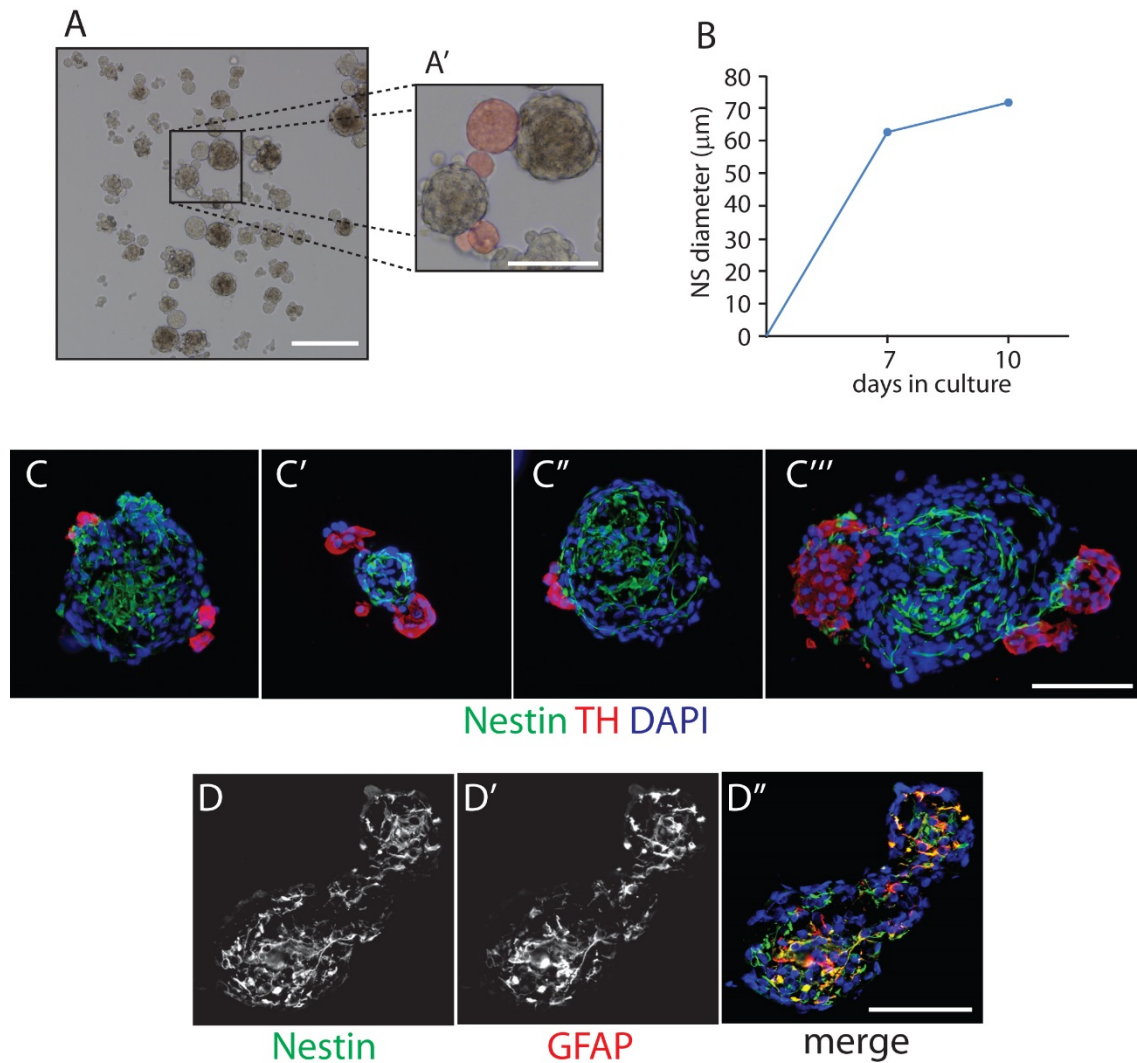
**Figura 16. Cambios del parénquima vascular del cuerpo carotídeo durante la exposición a hipoxia crónica.** **A** y **B** Análisis de la distribución del marcador endotelial CD31 mediante inmunohistoquímica en secciones del CC de rata, que muestra la profunda angiogénesis que tiene lugar en el órgano tras 14 días de hipoxia. Barra de escala, 150 μm. **C** Cuantificación del crecimiento en volumen del CC (en rojo) y del parénquima vascular (en azul) durante el estímulo hipóxico y la renormoxia. El volumen del CC se obtuvo teniendo en cuenta sólo la densidad de núcleos teñidos con DAPI, lo que delimita perfectamente el contorno del órgano. (n = 3-5 CC). Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

## 2 Proliferación y diferenciación de las células madre del cuerpo carotídeo *in vitro*

Las células madre del CC (CMCC) tienen la capacidad de dividirse clonalmente para formar neuroesferas, parecidas a las producidas por progenitores del SNC, cuando se cultivan en condiciones no adherentes (Pardal et al., 2007). El cultivo de las células del CC sobre un sustrato adherente constituye un fuerte estímulo para su diferenciación hacia miofibroblastos y células de músculo liso. Sin embargo, su crecimiento como neuroesferas permite el mantenimiento de la población de progenitores y promueve la generación de células de tipo neuronal (células glómicas), por lo que este ensayo fue elegido como herramienta para llevar a cabo muchos de los estudios que ocupan los objetivos del presente trabajo. Especialmente hemos utilizado el ensayo de neuroesferas para indagar en el funcionamiento del CC como nicho neurogénico. Especialmente hemos investigado sobre los factores del nicho del CC que podrían estar regulando la biología y el comportamiento de las células madre, tanto activando su proliferación como induciendo su diferenciación. Para ello, se han aplicado diferentes estímulos a las células en cultivo, y posteriormente se han analizado distintos parámetros para comprobar el efecto sobre los progenitores neurales. Como paso previo a los experimentos que siguen a continuación, se describe de forma detallada, el cultivo de neuroesferas de CC de rata.

En la figura 17 A y A' se muestra un cultivo de neuroesferas donde puede observarse la morfología de las mismas. En las neuroesferas pueden distinguirse una parte central esférica, donde se distribuyen los progenitores, y unos abultamientos que rodean a este núcleo central, compuestos por células neuronales diferenciadas. A estas estructuras periféricas las denominamos *blebs* (Figura 17 A') y son características de las neuroesferas de CC, pues no se han observado en esferas de ninguna otra región del sistema nervioso. Durante los primeros días de cultivo, del día 1 al 5 aproximadamente, se forma el núcleo de la neuroesferas, que va aumentando progresivamente de tamaño (Figura 17 B). A partir del quinto o sexto día de cultivo, se comienzan a distinguir los abultamientos de células diferenciadas que formarán los *blebs*. Los *blebs* pueden crecer hasta alcanzar, e incluso sobrepasar, el tamaño de un CC. En el panel A' pueden observarse dos neuroesferas cuyos *blebs* han sido pseudocoloreados en rojo para su distinción. En los paneles C-C''' y D-D''' se muestran diferentes ejemplos de secciones de neuroesferas teñidas y marcadas con distintos anticuerpos. Los progenitores, que expresan las proteínas Nestina y/o GFAP, se disponen en el núcleo de la esfera, mientras que las células neuronales que expresan TH, aparecen confinadas en los abultamientos periféricos.

En la figura 17 B se observa el tamaño alcanzado por las neuroesferas de CC cultivadas en normoxia con medio completo (ver sección 2.1 de “*Materiales y Métodos*”). La medida de diámetro refleja la capacidad proliferativa del progenitor que inició el clon. Este parámetro fue similar al de neuroesferas del SNC, dando un valor promedio de  $72,42 \pm 2,09 \mu\text{m}$  a los diez días de cultivo (Figura 17 B). Sin embargo, la *eficiencia de formación de neuroesferas* (EFN) fue menor que la de otras poblaciones de células madre neurales, con un valor promedio de  $0,35 \pm 0,06$  % de las células sembradas (Reynolds and Weiss, 1992; Davis and Temple, 1994; Reynolds and Rietze, 2005).



**Figura 17. Neuroesferas de cuerpo carotídeo.** **A** Imagen de campo claro de un cultivo de neuroesferas de CC. **A'** Detalle de dos neuroesferas mostrando los *blebs* pseudocoloreados en rojo. **B** Tamaño medio de las neuroesferas a diferentes tiempos de cultivo (n=4). **C-C'''** Rodajas de neuroesferas mostrando su estructura interna y la distribución de las células Nestina+ y TH+. **D-D'''** Imagen de dos neuroesferas fusionadas donde se distingue la expresión de las proteínas Nestina y GFAP en el núcleo de las neuroesferas. Barra de escala en A, 200 μm; en A', 100 μm; en C-C''', 100 μm; en D-D''', 100 μm.

Un aspecto importante a tener en cuenta es la variabilidad existente entre cultivos. El cultivo de neuroesferas es delicado y parece ser bastante sensible a las diferentes variaciones y perturbaciones de la manipulación experimental, por lo que las medidas de los parámetros mencionados pudieron variar ligeramente a lo largo de todo el estudio, que se llevó a cabo durante varios años, debido a la progresiva optimización del proceso.

### 3 Regulación de la proliferación y diferenciación de las células madre del cuerpo carotídeo *in vitro*

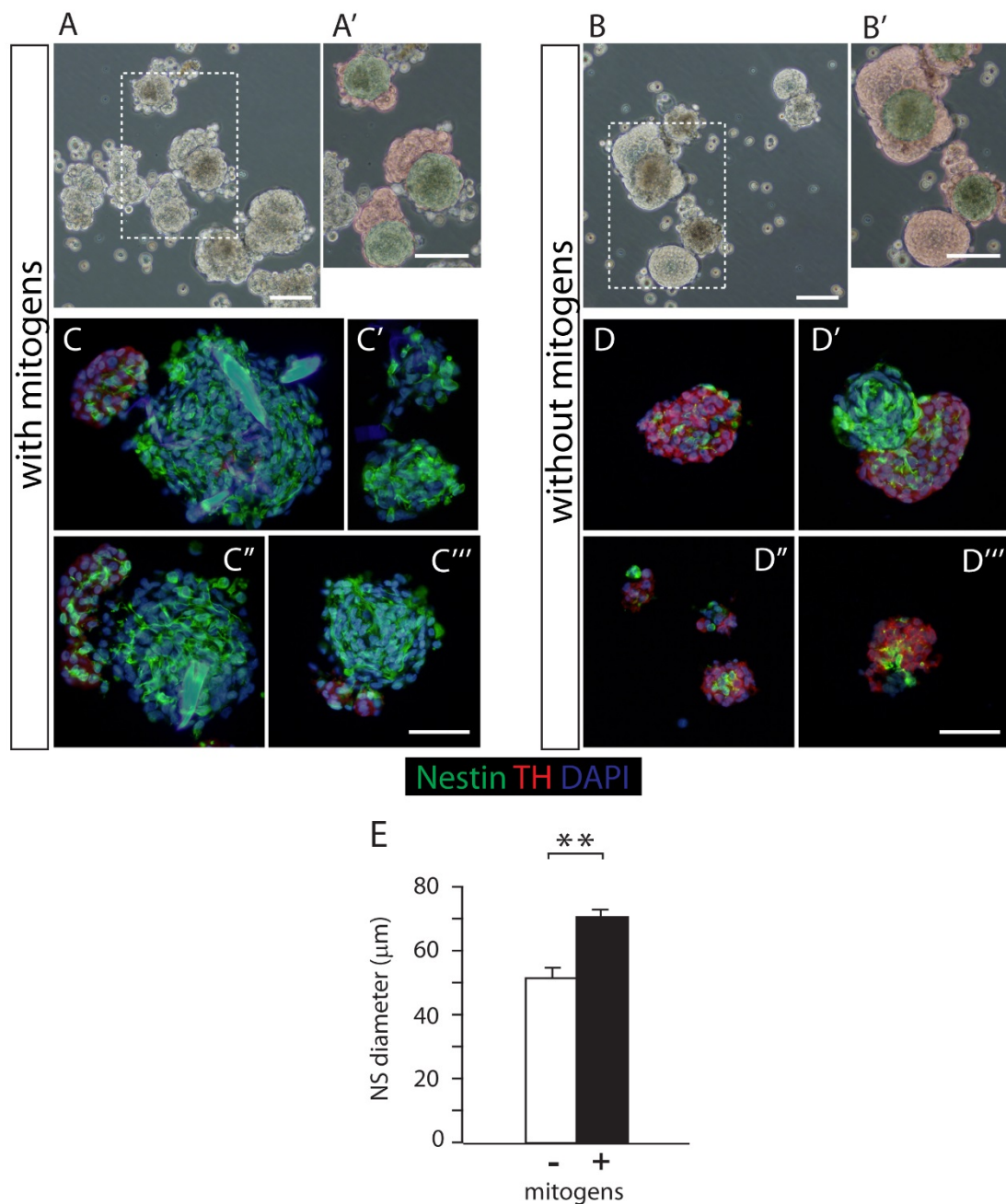
#### 3.1 Efecto de los mitógenos sobre la neurogénesis de las células madre del cuerpo carotídeo

Los cultivos de neuroesferas se llevan a cabo, generalmente, en presencia de los mitógenos FGF-2 y EGF, ya que varios trabajos han mostrado que estos factores promueven la proliferación mientras retienen las células en un estado indiferenciado (Reynolds and Rietze, 2005). Sin embargo, se ha demostrado posteriormente que los mitógenos interfieren en el proceso de diferenciación, pudiendo modificar el destino celular (Doetsch et al., 2002; Costa et al., 2011). Concretamente, los factores mitogénicos tienden a promover la diferenciación hacia el linaje glial, obstaculizando la neurogénesis (Schwindt et al., 2009; Costa et al., 2011). Para estudiar el efecto de los mitógenos sobre las neuroesferas de CC, se realizaron experimentos en presencia o ausencia de los factores FGF-2, EGF e IGF-1.

La figura 18 E revela que el diámetro de las neuroesferas cultivadas durante 10 días en presencia de los mitógenos aumentó de  $51,56 \pm 3,09 \mu\text{m}$  en la condición control, a  $70,73 \pm 1,98 \mu\text{m}$  ( $p < 0,001$ ) en las neuroesferas tratadas. Este dato indica que dichos factores están efectivamente promoviendo la proliferación de las células de la neuroesferas. La EFN también fue menor en la condición sin factores,  $0,33 \pm 0,05 \%$  frente a  $0,45 \pm 0,04 \%$  de las células sembradas ( $n=4$ ), aunque no llegó a ser una diferencia significativa ( $p=0,187$ ).

Las neuroesferas sin mitógenos suelen formar estructuras menos definidas morfológicamente, por lo que a veces fue difícil catalogarlas como neuroesferas en lugar de simples agregados celulares, lo cual obstaculizó la cuantificación del número de neuroesferas en los cultivos. Además, las neuroesferas de cultivos no tratados con mitógenos parecían poseer *blebs* de mayor tamaño, e incluso se observaron *blebs* no unidos a neuroesferas (Figura 18 D). Estos *blebs* independientes podían provenir bien de neuroesferas, es decir, haber crecido hasta tener un tamaño que llevase a su desancle de la estructura principal; o podían provenir de progenitores restringidos que en estas condiciones proliferan y se diferencian evitando la auto-renovación y formando agregados neuronales (ver figura 17 D-D'''). Los *blebs* independientes no se observaron nunca o en muy raras ocasiones en cultivos de neuroesferas tratados con mitógenos. En uno de estos cultivos se cuantificó el número de células positivas para los marcadores TH y Nestina con el fin de comparar la ratio entre ambos tipos celulares. En el cultivo sin factores mitogénicos, la ratio células Nestina+: células TH+ fue de 0,67, aumentando a 1,54 en la condición con mitógenos. Estas observaciones parecen indicar que, como en otros nichos neurogénicos, los mitógenos mantienen la indiferenciación de los progenitores, frenando la neurogénesis.





**Figura 18. Efecto de los mitógenos en neuroesferas de cuerpo carotídeo.** **A** y **B** Imagen en campo claro de neuroesferas con y sin mitógenos. **A'** y **B'** Detalle aumentado de neuroesferas con los *blebs* pseudocoloreados en rojo. **C-C'''** y **D-D'''** Micrografías de inmunofluorescencias de diferentes secciones de neuroesferas con y sin mitógenos marcadas con Nestina y TH. **E** Diámetro de las neuroesferas cultivadas en ausencia y presencia de mitógenos ( $n=7$ ). Las barras de error indican SEM.  $**p<0,001$ . Barra de escala en **A** y **B**, 100  $\mu\text{m}$ ; en **A'** y **B'**, 100  $\mu\text{m}$ ; en **C-C'''** y **D-D'''**, 50  $\mu\text{m}$ .

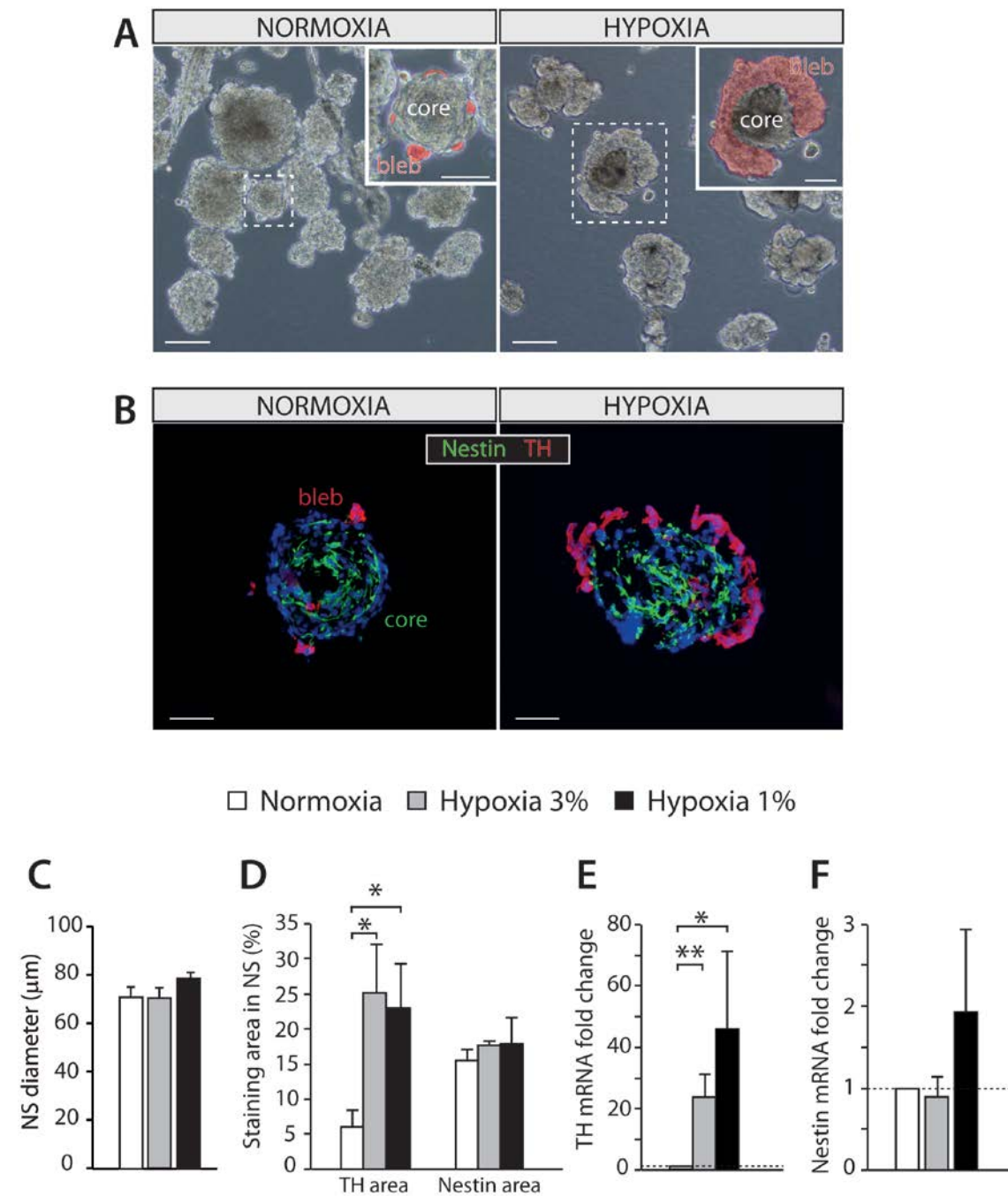


### 3.2 Efecto de la hipoxia sobre el cultivo de células madre del cuerpo carotídeo

Una vez definido y caracterizado el ensayo de neuroesferas *in vitro*, se procedió a la búsqueda de factores que modulan la biología de las CMCC, y que provocan su activación proliferativa durante la hipoxemia. Uno de los parámetros de interés más inmediato era la concentración de O<sub>2</sub>, ya que es el estímulo fisiológico más importante que induce el crecimiento del CC. Además, se ha descrito que los microambientes en los que encontramos células madre tienen concentraciones relativamente bajas de O<sub>2</sub>, que oscilan entre el 1 y el 8 % (Erecinska and Silver, 2001; Panchision, 2009).

Para investigar la sensibilidad a O<sub>2</sub> de los progenitores del CC se realizaron ensayos de neuroesferas expuestas a concentraciones variables de O<sub>2</sub>. En la figura 19 A se muestran imágenes representativas de neuroesferas cultivadas en condiciones del 21 y 3% de O<sub>2</sub>. El análisis cuantitativo de estos experimentos indica que, al contrario de lo que se esperaba, no hay diferencias significativas en el diámetro entre las neuroesferas cultivadas al 21, 3 o 1% de O<sub>2</sub> (Figura 19 A y C). La eficiencia de formación de neuroesferas tampoco varió entre las distintas condiciones (EFN: Nx 0,22 ± 0,06; Hx3% 0,22 ± 0,08; Hx1% 0,16 ± 0,07). Sin embargo, la hipoxia produjo un incremento en el número y tamaño de los *blebs* en las neuroesferas (Figura 19 A), lo que sugiere que la carencia de O<sub>2</sub> induce la diferenciación dopaminérgica. Esta idea se confirmó mediante el análisis de la expresión del gen TH por qRT-PCR (Figura 19 E). Además, se definió, en secciones de neuroesferas, las áreas de diferenciación (TH+) e indiferenciación (Nestina+) (ver apartado 2.5.2 de “Materiales y Métodos”). La región TH+ experimentó un considerable incremento en los cultivos realizados al 3 y al 1% de O<sub>2</sub>, mientras que el área Nestina+ se mantuvo constante (Figura 19 D). Estos datos indican que la hipoxia induce la diferenciación neuronal dopaminérgica de los progenitores del CC, tal y como ocurre en otras regiones del sistema nervioso (Morrison et al., 2000). Por otra parte, el análisis inmunocitoquímico de la región Nestina, la medida de diámetro y la expresión del ARNm de Nestina (Figura 19 D, C y F), señalan que la hipoxia no favorece la proliferación de las CMCC.

Todos los datos parecen indicar que la hipoxia no afecta directamente a la capacidad de auto-renovación de las CMCC, pero tampoco induce su diferenciación, ya que en este último caso produciría una disminución de células Nestina+. La hipoxia parece afectar a un progenitor comprometido hacia el linaje dopaminérgico, favoreciendo su proliferación y diferenciación, lo que lleva a que las neuroesferas presenten un mayor número de células TH+.



**Figura 19. Efecto de la hipoxia sobre la proliferación y diferenciación de las células madre del cuerpo carotídeo.** **A** Imágenes de campo claro de neuroesferas primarias cultivadas a 21% o 3 % de O<sub>2</sub>. En ambos casos los *blebs* se han pseudocoloreado en rojo. **B** Imágenes de inmunofluorescencias frente a Nestina y TH en rodajas de neuroesferas, donde se aprecia el efecto de la hipoxia sobre el número de células TH+. **C** Cuantificación del diámetro del núcleo de las neuroesferas cultivadas durante 10 días a diferentes concentraciones de O<sub>2</sub> (n=6 para normoxia (Nx) e hipoxia (Hx) al 3% de O<sub>2</sub>, y n=3 para Hx al 1% de O<sub>2</sub>). **D** Cuantificación del área de tinción Nestina+ o TH+ en secciones de neuroesferas de diferentes cultivos. La zona TH+ aumenta claramente bajo condiciones de Hx, mientras que la región Nestina+ no varía significativamente (n=4 cultivos). **E** y **F** Resultados de expresión de los genes TH y Nestina en cultivos a diferentes concentraciones de O<sub>2</sub> (n=7 para Nx e Hx al 3% de O<sub>2</sub>, y n=4 para Hx al 1% de O<sub>2</sub>). Las barras de error indican SEM. \*p< 0,05 y \*\*p<0,01. Barra de escala en A, 100 μm (50 μm, en los detalles); en B, 50 μm.

### 3.3 Factores neurovasculares

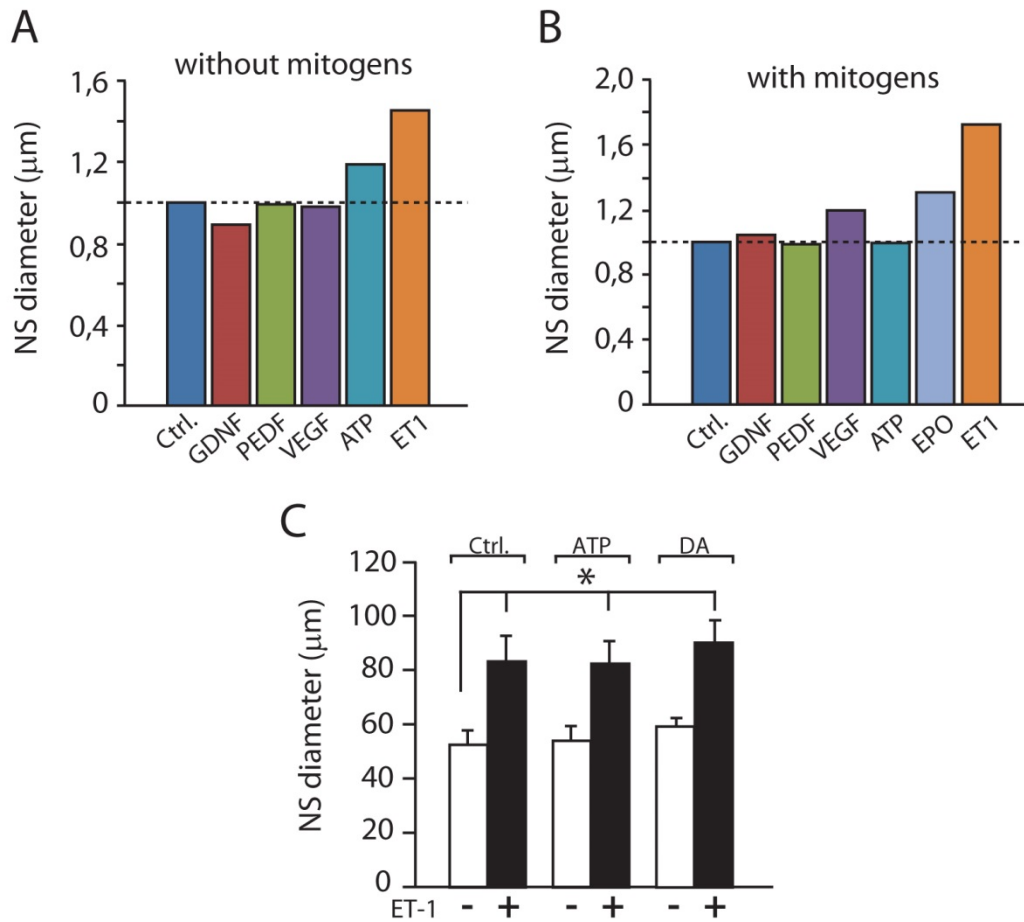
La biología de las células madre está estrechamente regulada por el microambiente que las rodea. La vasculatura es un componente indispensable de estos nichos ya que aporta factores solubles que llegan a través de la circulación y factores paracrinós secretados por las células endoteliales de los vasos. (Mendez-Ferrer et al., 2008; Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Por su parte, el sistema nervioso, a través de las señales o factores neuronales, ejerce una acción moduladora sobre las células madre, conectando la demanda y las condiciones fisiológicas con el comportamiento de estas células. (Mendez-Ferrer et al., 2009; Berg et al., 2013). Con respecto al CC, ambos componentes, vascular y neuronal, forman parte importante de la fisiología del órgano, por lo que factores secretados por estos tejidos podrían ejercer un papel en el funcionamiento del nicho neurogénico del CC. Basándonos en estas ideas, se llevaron a cabo experimentos diseñados para analizar el efecto de varios factores del nicho, vasculares y neuronales, sobre el cultivo de neuroesferas.

Los factores neurovasculares testados en cultivo fueron: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF), Eritropoyetina (EPO), Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF), Adenosín Trifosfato (ATP), Dopamina (DA), Bromocriptina (agonista D2 dopaminérgico) y Endotelina-1 (ET-1). Estas sustancias se añadieron a los cultivos cada dos días. En la tabla 5 se indican las concentraciones a las que se administraron los factores a las células en cultivo, y el vehículo en el que se diluyeron.

**Tabla 5. Factores estudiados en cultivos de neuroesferas de cuerpo carotídeo.**

<b>Factor</b>	<b>Dosis</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Referencia</b>
<b>VEGF</b>	0,1 µg/ml	PBS+0,1%BSA	R&D Systems (494-VE)
<b>GDNF</b>	50 ng/ml	PBS+0,1%BSA	R&D Systems
<b>EPO</b>	0,5;5 U/ml		NeoRecormon (10089494)
<b>PEDF</b>	20 ng/ml	H <sub>2</sub> O mQ	R&D Systems
<b>ATP</b>	10-100 µM	H <sub>2</sub> O mQ	SIGMA-ALDRICH
<b>ET-1</b>	0,01-0,1 µM	H <sub>2</sub> O mQ	SIGMA-ALDRICH (E7764)
<b>DA</b>	0,5-10 µM	H <sub>2</sub> O mQ	SIGMA-ALDRICH
<b>Bromocriptina</b>	0,5 µM	Etanol	SIGMA-ALDRICH

Los diámetros de neuroesferas tratadas durante 10 días con los diferentes factores se muestran en la figura 20. Debido a que este estudio se llevó a cabo durante varios años, el protocolo del ensayo sufrió diferentes modificaciones. En líneas generales, los diferentes factores fueron analizados en presencia o ausencia de mitógenos, en normoxia e hipoxia, e incluso con altas (15%) y bajas (5%) concentraciones de suero, para encontrar la condición óptima que permitiera observar un efecto claro. No se obtuvieron resultados concluyentes con ningún factor excepto con ET-1 (Figura 20).



**Figura 20. Tamaño de las neuroesferas de cuerpo carotídeo cultivadas con diferentes factores neurovasculares.** **A** y **B** Diámetros, normalizados respecto a la condición control, de neuroesferas tratadas con diferentes factores en ausencia y presencia de mitógenos, al 21% de O<sub>2</sub> y 15% de FBS (n=2 cultivos). **C** Diámetros de neuroesferas tratadas al mismo tiempo con ET-1 (0,01 μM) y ATP (50 μM) o DA (10 μM) (n=3), cultivadas al 21% de O<sub>2</sub> y 15% de FBS en presencia de mitógenos. Las barras de error expresan SEM. \*p< 0,05.

La ET-1 fue el único factor que produjo un efecto potente y constante sobre el diámetro de las neuroesferas en todas las condiciones en las que fue estudiada. El ATP y la DA se testaron solos y en presencia de ET-1 para analizar si ambos factores potenciaban el efecto de la ET-1 (Figura 20 C). Como se muestra en la figura, estos factores no tuvieron efecto sobre el diámetro ni contribuyeron a aumentar el efecto sobre las neuroesferas producido por la ET-1.

## 4 Acción de la ET-1 sobre la proliferación y diferenciación *in vitro* de las células madre del cuerpo carotídeo

### 4.1 La ET-1 promueve la proliferación de las células madre del cuerpo carotídeo

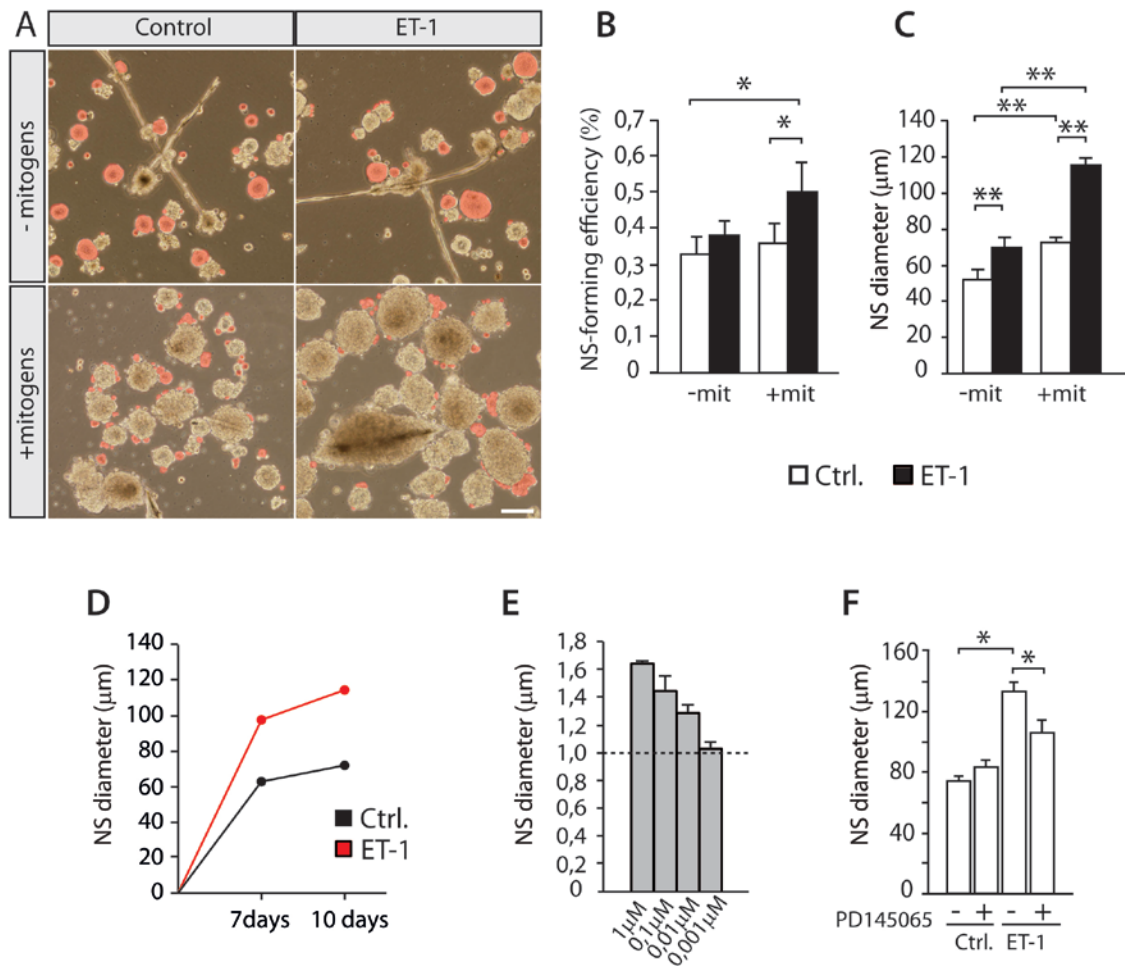
El efecto de la ET-1 sobre la proliferación de las CMCC se estudió en diferentes condiciones de cultivo a lo largo de todo el trabajo, aunque aquí sólo se exponen los datos obtenidos en cultivos realizados al 21% de O<sub>2</sub>, con ET-1 a 0,01 µM, 15% de FBS, y en ausencia y presencia de mitógenos. La ET-1 produjo un aumento considerable en el diámetro de las neuroesferas, siendo su efecto más apreciable en presencia de mitógenos ( $72,42 \pm 2,09$  µm en la condición control y  $114,53 \pm 3,92$  µm en presencia de ET-1, n=4 cultivos; p<0,01) (Figura 21 A y C). La ET-1 también produjo un aumento claro de la EFN en presencia de mitógenos ( $0,36 \pm 0,056$  % en la condición control y  $0,5 \pm 0,08$  % con ET-1; n=9; p<0,05;) (Figura 21 B). Estos resultados sugieren que ET-1 actúa sobre la población celular que los mitógenos están estimulando; que como hemos mostrado anteriormente (ver apartado 3.1 de “Resultados”), es la población de progenitores neurales. Las neuroesferas que se generan en ausencia de mitógenos tienen un núcleo central de progenitores muy reducido. Por el contrario, cuando las neuroesferas se forman en presencia de mitógenos, el núcleo de la esfera es mayor, con más progenitores, y el efecto de la ET-1 es más evidente, ya que actúa sobre un número mayor de progenitores.

Los experimentos con ET-1, que se presentan en las figuras siguientes, se realizaron siempre en presencia de los mitógenos FGF-2, EGF, IGF-1 (*medio completo*; ver sección 2.1 de “Materiales y Métodos”). En el gráfico 21 D se muestra el diámetro de neuroesferas con y sin ET-1 a los 7 y 10 días de cultivo. El diámetro aumentó ligeramente a partir de los 7 días ( $62,7 \pm 3,2$  µm a los 7 días y  $71,8 \pm 1,82$  µm a los 10 días en la condición control;  $97,5 \pm 6,7$  µm a los 7 días y  $114,4 \pm 4,0$  µm a los 10 días con ET-1; p>0,05). La proliferación de las células en las neuroesferas fue más rápida durante la primera semana de cultivo, lo que sugiere que el número de divisiones de los progenitores podría ser limitado, al menos, en los progenitores más activos. El segundo periodo de crecimiento más lento coincide, aproximadamente, con la fase en la que los *blebs* comienzan a desarrollarse. Esto parece indicar que existe una primera fase de proliferación, más activa durante los primeros 7 días, y una fase posterior de diferenciación. Se realizó también un estudio dosis-respuesta a varias concentraciones crecientes de ET-1. En el gráfico 21 E aparecen los resultados de este ensayo mostrando el aumento de diámetro de las neuroesferas provocado por ET-1 a cada concentración. A las dosis estudiadas no se encontró una saturación de la respuesta; los progenitores en las neuroesferas fueron capaces de responder a concentraciones crecientes del factor de forma proporcional.

El efecto provocado por la ET-1 se abolió parcialmente por el antagonista PD145065, sustancia que inhibe de manera inespecífica los receptores de endotelina tipo A y tipo B (ET-RA y ET-RB). En el diagrama 21 F se observa que el tratamiento con PD145065 previno parcialmente, pero de forma significativa, el aumento de diámetro provocado por la adición de ET-1 (ET-1:  $132,67 \pm 6,23$  µm; PD145065+ET-1:  $105,55 \pm 8,19$  µm; p<0,05). Estos datos sugirieron que la ET-1 añadida exógenamente a los cultivos de neuroesferas actúa específicamente a través de los receptores canónicos del péptido. Para confirmar este resultado, se llevó a cabo un experimento de interferencia de la traducción de los ARNm de ET-

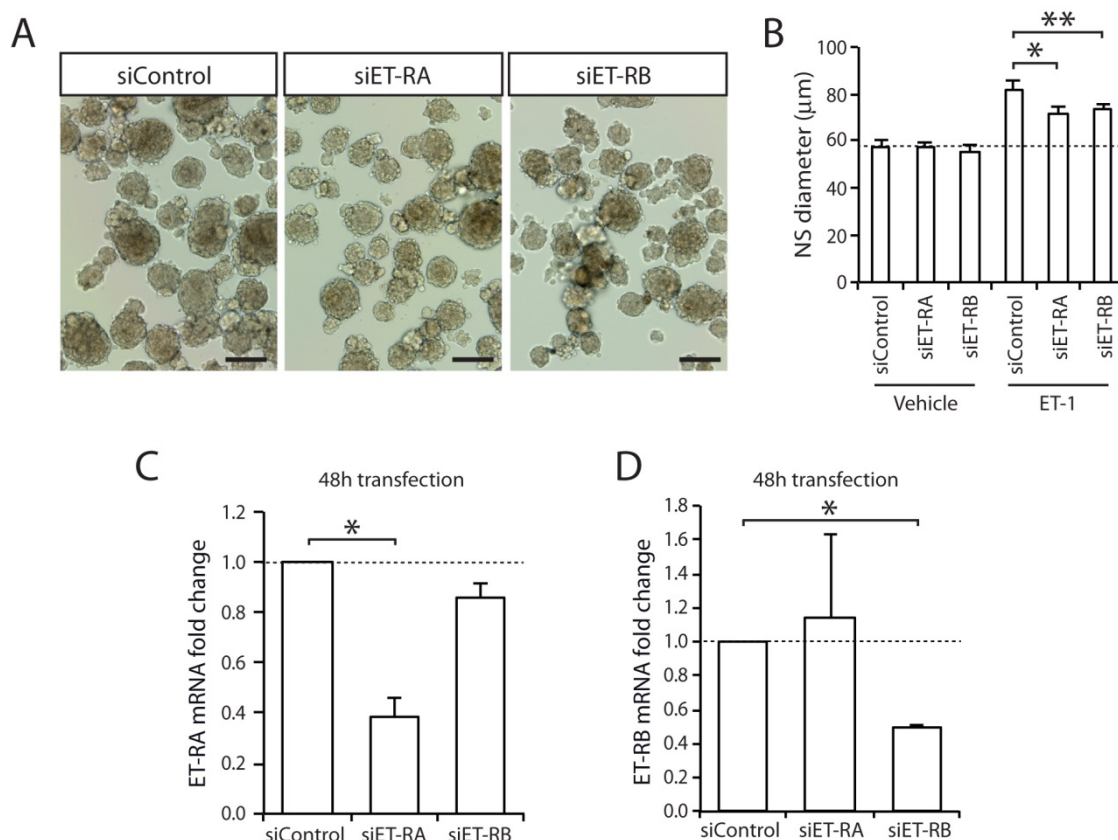


RA y ET-RB mediante el uso de moléculas de ARN de interferencia (ARNi) específicas para cada gen (siET-RA, siET-RB y siControl) (Figura 22 C y D). En la figura 22 A y B se muestra la disminución de la respuesta a ET-1 provocada por la interferencia de cada receptor.



**Figura 21. Efecto de la ET-1 sobre el cultivo de neuroesferas de cuerpo carotídeo.** **A** Cultivos de neuroesferas primarias que muestran el aumento del diámetro del núcleo de las neuroesferas tras 10 días en cultivo, en presencia y ausencia de ET-1 y mitógenos. Los *blebs* con células diferenciadas están pseudocoloreados en rojo. Barra de escala, 100μm. **B** y **C** Cuantificación de la EFN y el diámetro de los cultivos de neuroesferas tratados con ET-1 (0,01 μM) y mitógenos (mit) (n=4 cultivos). **D** Diámetros de las neuroesferas a los 7 y 10 días de cultivo (n=3). **E** Efecto dosis-respuesta de ET-1 sobre el diámetro de neuroesferas normalizados a la situación control (Ctrl) (n=3). **F** Medida del diámetro de las neuroesferas de cultivos (n=3) tratados con el antagonista PD145065 (1 μM), que se añadió a los cultivos de neuroesferas cada dos días, 30 minutos antes que la ET-1 (0,01 μM). Las barras de error indican SEM. \*p< 0,05, \*\*p<0,01.

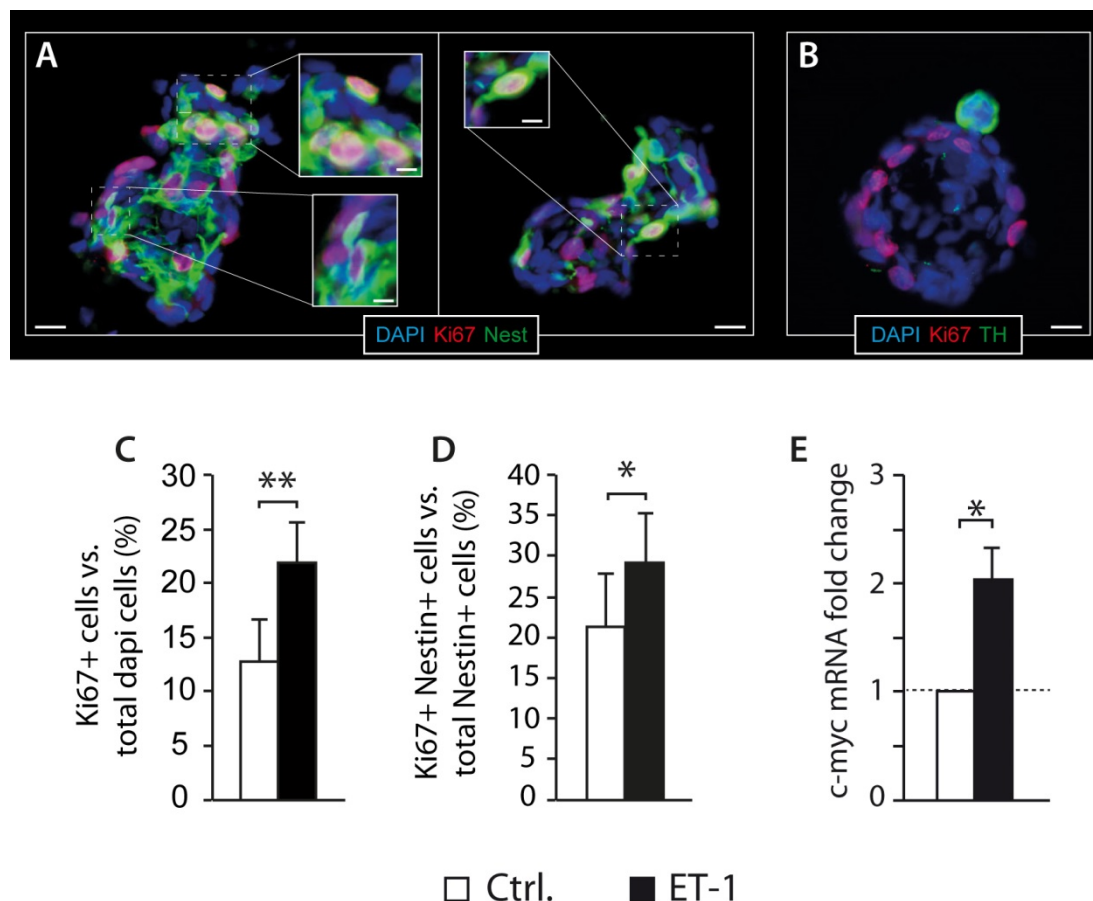




**Figura 22. Inhibición de la expresión de los receptores de ET-1 mediante ARNi.** **A** Imágenes representativas de neuroesferas tras 7 días de cultivo transfectadas con los ARNi indicados. La ET-1 (0,01 μM) se añadió a las 64 horas de la transfección. Barra de escala, 50 μm. **B** Diámetros de las neuroesferas tras la disminución de la expresión de los receptores de ET-1 causada por los ARNi (50nM) en cultivos tratados con (n=5) y sin (n=4) ET-1 (0,01 μM). **C** y **D** Disminución selectiva de los ARNm de ET-RA (n=3 cultivos) o ET-RB (n=2) tras 48 horas de la transfección de las neuroesferas. Las barras de error indican SEM. \*p<0,05.

Por último, para comprobar que la ET-1 efectivamente promovía la proliferación, se realizó una cuantificación más detallada con el marcador de proliferación Ki67 en secciones finas de neuroesferas. En las figuras 23 A y B se muestran preparaciones teñidas con los marcadores Nestina (verde), TH (verde) y Ki67 (rojo). Las neuroesferas se cultivaron durante siete días, es decir antes de la fase de diferenciación, con el fin de encontrar un número considerable de células en división. Puede observarse que las células proliferativas se distribuyen únicamente por el núcleo de la neuroesferas, no encontrándose células doble positivas TH/Ki67 en ninguno de los 4 cultivos analizados.

El gráfico 23 C muestra la cuantificación de células Ki67+ en las neuroesferas de CC. La ET-1 provocó un aumento en la proliferación total del 70% ( $12,84 \pm 3,81$  % en la condición control;  $21,83 \pm 3,79$  % en presencia de ET-1;  $p<0,01$ ). Centrándonos en la población de progenitores Nestina+, el péptido ET-1 incrementó la proliferación de éstos en un 37% ( $21,42 \pm 6,42$  % en la condición control;  $29,25 \pm 6,10$  % en presencia de ET-1;  $p=0,05$ ). Este análisis sugiere que ET-1 induce la activación proliferativa, no sólo de los progenitores neurales Nestina+, sino también de otras células de la neuroesferas que no expresan las proteínas Nestina o TH.



**Figura 23. Efecto de la ET-1 sobre los progenitores neurales del cuerpo carotídeo. A** Inmunofluorescencia de Nestina y Ki67 en secciones finas de neuroesferas. **B** La detección de TH y Ki67 en la neuroesferas muestra que las células proliferativas se restringen al núcleo de la esfera y no aparecen en los *blebs* diferenciados. **C** Cuantificación de las células Ki67+ frente a las células totales, en secciones de neuroesferas cultivadas con o sin ET-1 (0,01 mM) durante 7 días (n=4 cultivos). **D** Cuantificación de células doble positivas Nestina/Ki67 frente a células Nestina+ totales en las mismas secciones de neuroesferas. **E** Incremento en la expresión del ARNm de c-myc en neuroesferas tratadas con ET-1 (n=5 cultivos). Barra de escala en A y B, 25  $\mu$ m (detalles 10  $\mu$ m). Las barras de error expresan SEM. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

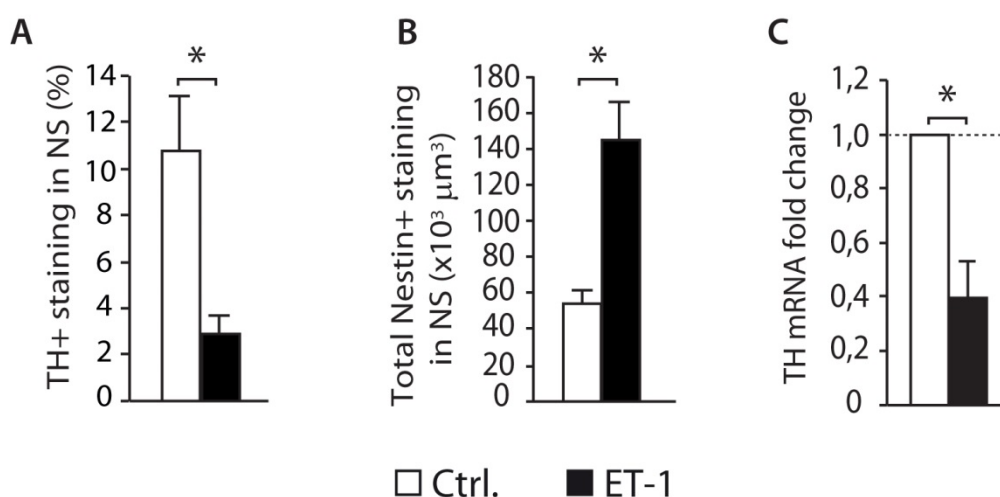
Además del marcador Ki67, utilizamos los niveles del factor de transcripción *c-myc* como reflejo de la activación de la proliferación. *C-myc* es un proto-oncogen implicado en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular, el cual está implicado en la acción mitogénica de la ET-1 (Shichiri et al., 1998). El gráfico 22 E muestra el aumento en la expresión del ARNm de *c-myc* provocado por ET-1 en neuroesferas de CC. Este resultado, junto con los datos anteriormente mostrados sobre la implicación de los receptores tipo A y tipo B, sugiere que la ET-1 actúa a través de su vía canónica para regular la proliferación de las células progenitoras del CC (ver apartado 3.2.2 de la "Introducción").

## 4.2 La ET-1 frena la diferenciación dopaminérgica

Además de regular la proliferación de los progenitores del CC, la ET-1 produjo una reducción en el tamaño de los *blebs* en relación al tamaño de la esfera (Figura 21 A), lo que sugeriría que el péptido podría estar modificando la diferenciación de los progenitores hacia el linaje dopaminérgico. Para comprobar dicha hipótesis, se realizó un análisis de los marcadores Nestina y TH en secciones de neuroesferas (ver sección 1.8 de “Materiales y Métodos”).

En el gráfico 24 A se observa que la región delimitada por la expresión del marcador de diferenciación TH disminuyó en las neuroesferas tratadas con ET-1 ( $10,80 \pm 2,35$  % en la condición control;  $2,90 \pm 0,80$  % en presencia de ET-1;  $p < 0,05$ ). Esta disminución sobre la expresión de TH también se reflejó en el análisis de su ARNm (Figura 24 C). La fracción indiferenciada, identificada con el marcador Nestina, no sufrió variación significativa. Sin embargo, las neuroesferas aumentaron de volumen tras el tratamiento con ET-1, siendo  $200.369 \mu\text{m}^3$  de media en los cultivos control y  $794.893 \mu\text{m}^3$  en los cultivos con ET-1 (datos calculados a partir de las medidas de diámetros). Teniendo en cuenta estos datos, la ET-1 aumentó el área de Nestina en términos absolutos más de 2,5 veces (Figura 24 B) ( $53.972,49 \pm 7.310,79 \mu\text{m}^3$  en la condición control;  $144.457,17 \pm 21.297,78 \mu\text{m}^3$  en presencia de ET-1;  $p < 0,05$ ).

Estos resultados reafirman el concepto de que la ET-1 incrementa la proliferación de los progenitores y mantiene su auto-renovación, pues la región Nestina+ se mantiene proporcionalmente constante tras el tratamiento con el péptido. Por otro lado, la ET-1 también induce la proliferación de otros tipos celulares del núcleo de las neuroesferas, al mismo tiempo que reduce la diferenciación dopaminérgica.

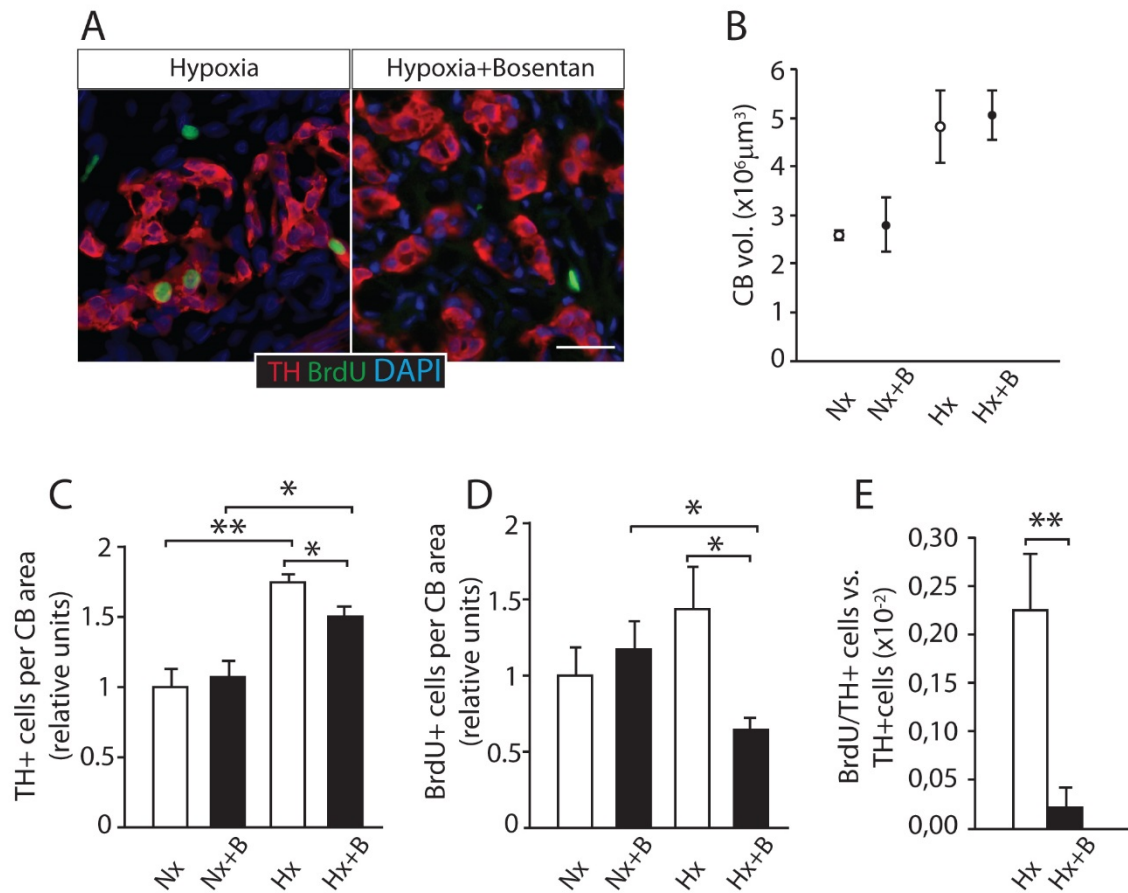


**Figura 24. Efecto de la ET-1 sobre la diferenciación de los progenitores neurales del cuerpo carotídeo.** **A** Cuantificación del área de tinción TH+ en secciones finas de neuroesferas cultivadas con o sin ET-1 (0,01  $\mu\text{M}$ ) ( $n=3$  cultivos). **B** Cuantificación de la tinción Nestina extrapolada al volumen total de las neuroesferas ( $n=3$  cultivos). **C** qRT-PCR mostrando la disminución en la expresión de TH en neuroesferas expuestas a la acción de la ET-1 ( $n=5$  cultivos). Las barras de error indican SEM. \* $p < 0,05$ .

## 5 Papel fisiológico de la ET-1 sobre el crecimiento del cuerpo carotídeo durante hipoxia crónica

Tras el estudio de los efectos de la ET-1 en la regulación del comportamiento de los progenitores del CC *in vitro*, se llevaron a cabo experimentos para dilucidar si este factor participa en el crecimiento del CC en respuesta a hipoxia crónica. Para ello, se bloqueó la señalización de ET-1 inhibiendo sus receptores mediante bosentan. El bosentan es un antagonista no peptídico, activo por vía oral, de los receptores ET-RA y ET-RB (Clozel et al., 1993; Clozel et al., 1994; Treiber et al., 2004).

En este experimento se analizó la proliferación mediante la detección de BrdU. En la figura 25 A se muestran dos imágenes de inmunofluorescencia correspondientes a secciones de CC marcadas con TH (rojo) y BrdU (verde) de animales controles y tratados con bosentan. El BrdU fue administrado a los roedores mediante una sola inyección intraperitoneal justo antes de comenzar con el tratamiento hipóxico. Nótese una menor frecuencia en la aparición de células BrdU+ en los animales que recibieron el bosentan. El gráfico 25 D indica la cuantificación de la proliferación. Los animales sometidos a hipoxia (Hx) durante 7 días experimentaron un incremento en el número de células BrdU+, que fue abolido por la administración de bosentan (B) ( $13,5 \times 10^{-5} \pm 2,7 \times 10^{-5}$  cél/ $\mu\text{m}^2$  en Hx, y  $60 \times 10^{-6} \pm 7,9 \times 10^{-6}$  cél/ $\mu\text{m}^2$  en Hx+B;  $p < 0,05$ ). La reducción de células BrdU+ fue especialmente marcada en la población de células glómicas ( $2,25 \times 10^{-3} \pm 5,7 \times 10^{-4}$  cél BrdU+TH+/cél TH+ en Hx, y  $2,1 \times 10^{-4} \pm 2,1 \times 10^{-5}$  cél BrdU+TH+/cél TH+ en Hx+B;  $p = 0,01$ ) (Figura 25 E). También se encontró una reducción en la densidad de células glómicas en los animales tratados con la droga (Figura 25 C) ( $0,002514 \pm 75 \times 10^{-6}$  cél/ $\mu\text{m}^2$  en Hx, y  $0,002169 \pm 92 \times 10^{-6}$  cél/ $\mu\text{m}^2$  en Hx+B;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, como puede apreciarse en el panel 25 B, el volumen total del órgano no se vio afectado. El bosentan reprime la proliferación ocurrida durante el estímulo hipóxico en el CC, y especialmente parece afectar al parénquima neural, sugiriendo la implicación de ET-1 en el proceso de hipertrofia del órgano en respuesta a hipoxia.



**Figura 25. Implicación de ET-1 en la hipertrofia ocurrida en el cuerpo carotídeo en hipoxia crónica.** **A** Imágenes de secciones histológicas de CC de animales expuestos a hipoxia con o sin bosentan. Barra de escala en A y B, 25  $\mu\text{m}$ . **B** Volumen total de CC de ratas en normoxia o hipoxia con o sin bosentan (B) (100 mg/Kg/día). El bloqueo de los receptores no afecta al crecimiento general del órgano. **C** Cuantificación de la densidad de células glómicas TH+ en secciones de CC de animales expuestos a normoxia (Nx) o hipoxia (Hx) y tratados sistémicamente con el antagonista bosentan (B), donde se muestra que el bloqueo de receptores previene parcialmente el crecimiento del parénquima neurosecretor del órgano. **D** Cuantificación de células BrdU+. **E** Cuantificación de células dobles positivas BrdU/TH en animales expuestos a hipoxia con o sin bosentan. (n=5 CC, pertenecientes a 3-4 animales por condición). Se analizaron 3 rodajas de la región media del órgano. Las barras de error indican SEM. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

## **6 Producción de ET-1 y presencia de sus receptores en el cuerpo carotídeo**

Además de en el tejido vascular donde fueron descubiertas, las endotelinas se localizan y sintetizan en una gran variedad de tejidos y órganos, incluido el sistema nervioso (Nakamaru et al., 1989; Takahashi et al., 1991). En cuanto al CC, se ha detectado presencia de ET-1 y del receptor ET-RA en las células glómicas (McQueen et al., 1995; He et al., 1996), lo que convierte a estas células, junto con las células endoteliales de la vasculatura, en una posible fuente de ET-1 en el CC. En este apartado se exponen los estudios realizados para localizar la presencia de ET-1 y la distribución de sus receptores A y B en las distintas poblaciones celulares que conforman el CC.

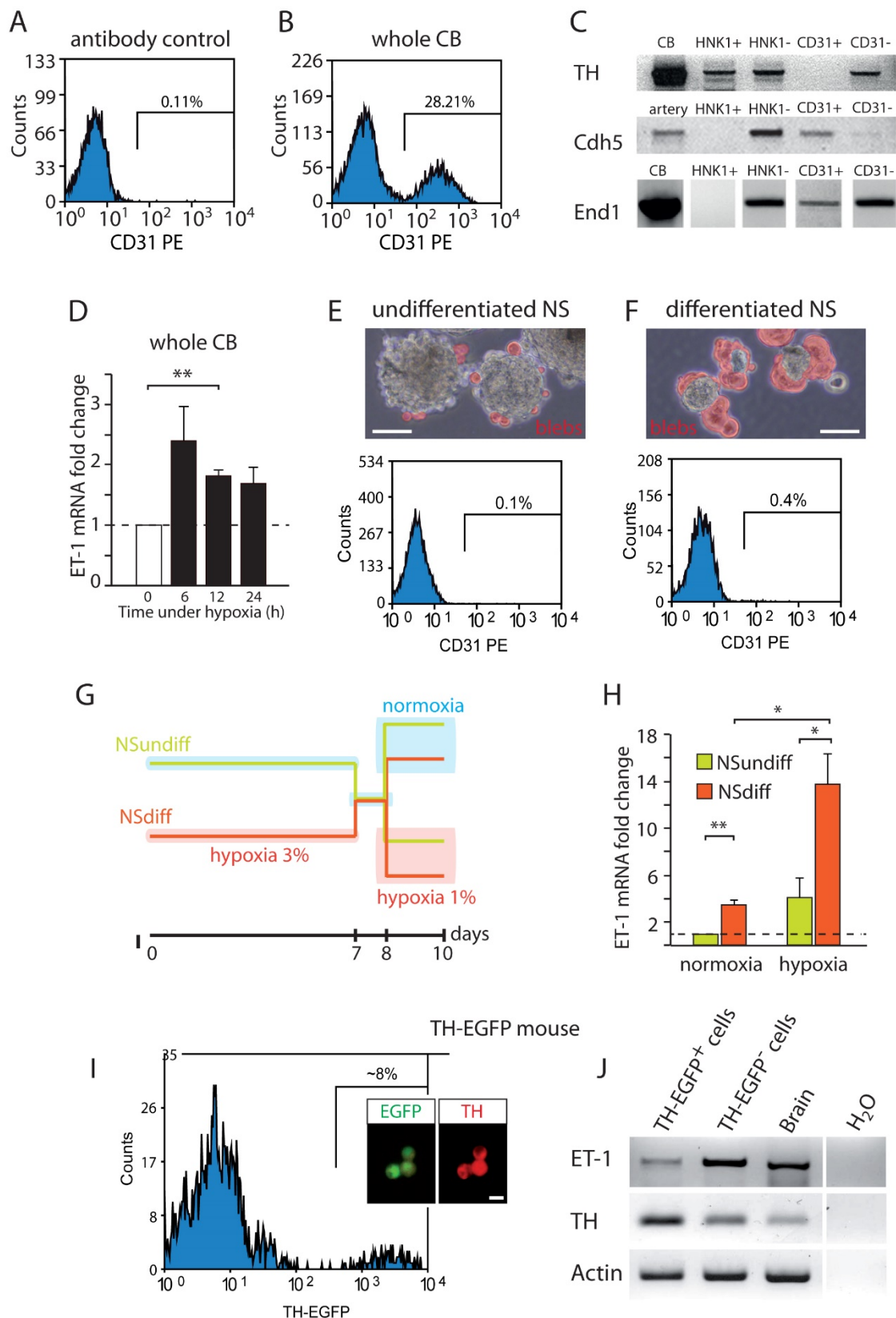
### **6.1 Células productoras de ET-1 en el cuerpo carotídeo; células endoteliales y células glómicas**

Varios estudios han descrito la presencia de ET-1 en los glomérulos del CC de rata utilizando técnicas histológicas y de radiomarcaje (McQueen et al., 1995; Paciga et al., 1999; Chen et al., 2002). No obstante, la existencia de ET-1 en las células glómicas no se ha demostrado de forma inequívoca. En este apartado se describen los experimentos realizados para identificar los tipos celulares del CC productores de ET-1.

En la figura 26 se presentan los resultados del análisis de la expresión del ARNm del gen de la ET-1 (Edn1) en distintas poblaciones celulares aisladas mediante citometría de flujo (paneles A-C). El gen Edn1, se expresa en CC completo, en células positivas para los marcadores endoteliales CD31 y Cdh5, y en la fracción CD31 negativa. La expresión de la ET-1 en las células CD31 negativas sugiere la existencia de otra población productora de ET-1 en el CC, además de las células endoteliales. Las células HNK-1+ se utilizaron como un subtipo de células glómicas (Pardal et al., 2007) pero resultaron no poseer ET-1. Aunque lo apropiado hubiese sido analizar la población completa de células glómicas, no tenemos hasta la fecha un protocolo que nos permita el correcto aislamiento y purificación de estas células de rata en condiciones que preserven el ARNm.

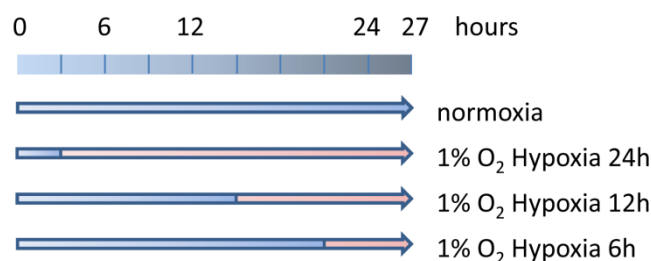
Posteriormente, se analizó mediante qRT-PCR la regulación por hipoxia del gen Edn1 en el CC. Para ello, se cultivaron células de CC al 1% de O<sub>2</sub> durante varios periodos de tiempo (ver esquema del diseño experimental en Figura 27) En el gráfico de la figura 26 D se puede apreciar que la expresión del ARNm de la ET-1 incrementó significativamente tras 12 horas en hipoxia.





**Figura 26. Expresión de ET-1 en las células glómicas del cuerpo carotídeo.** **A** Histograma de citometría de flujo que muestra la fluorescencia basal e inespecífica del anticuerpo secundario. **B** Histograma que muestra la población endotelial CD31+ entre las células disociadas de CC de rata. **C** PCR mostrando la expresión de TH, Caderina 5 (Cdh5) y ET-1 en diferentes poblaciones de células dispersas de CC separadas por citometría de flujo. **D** qRT-PCR que muestra la inducción de ET-1 en células de CC expuestas al 1% de hipoxia durante los periodos indicados (n=5 cultivos). **E** y **F** Arriba, imágenes de cultivos de neuroesferas bajo condiciones de diferenciación o

indiferenciación (*blebs* pseudocoloreados en rojo), donde se observan las diferencias en el número de células diferenciadas. Abajo, histogramas de citometría de flujo mostrando la ausencia de células CD31+ en ambos tipos de neuroesferas. **G** Esquema que muestra los tiempos de cultivo en cada condición para obtener los cuatro tipos diferentes de muestras analizadas en el panel H. Las células de CC se cultivaron durante 7 días en las diferentes condiciones que darían lugar a las NSdiff y las NSundiff. A partir de este paso, ambas poblaciones fueron sometidas a los mismos estímulos. Se cultivaron durante 1 día al 21% de O<sub>2</sub> para establecer un punto de inicio común, tras el cual, cada grupo fue incubado al 21% y al 1% de O<sub>2</sub>. **H** qRT-PCR ilustrando los altos niveles de expresión de ET-1 en NSdiff comparados con NSundiff, tras dos días en normoxia o hipoxia (1% O<sub>2</sub>, n=3 cultivos). **I** Histograma de citometría de flujo de células disociadas de CC de ratones transgénicos TH-EGFP. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran que las células EGFP+ purificadas expresan la enzima TH (aproximadamente 100 células analizadas). **J** Expresión de ET-1 en células purificadas EGFP+. Barra de escala en E y F, 50 µm; en I, 10 µm. Las barras de error indican SEM. \*p<0,05, \*\*p<0,01.



**Figura 27. Esquema del tratamiento hipóxico recibido por los cultivos de células dispersas de cuerpo carotídeo.**

La producción de ET-1 se estudió también en las neuroesferas de CC siguiendo un protocolo para obtener dos tipos diferentes de neuroesferas, una enriquecida en progenitores, (neuroesferas indiferenciadas o NSundiff), y otra enriquecida en el componente neuronal (neuroesferas diferenciadas o NSdiff). Los detalles para la obtención de estos dos tipos de muestra se exponen más adelante en el apartado 8.1 del capítulo de “Resultados”. Estas neuroesferas ofrecían la posibilidad de comparar la expresión de genes y atribuir la diferencia a la presencia de progenitores o a la presencia de células glómicas. Es decir, si un gen se aparecía preferentemente en NSdiff, sugería que estaba siendo expresado por las células glómicas. El gráfico 26 H muestra que End1 se expresó 3,5 veces más en NSdiff que en NSundiff en normoxia y esta diferencia se acrecentó cuando las neuroesferas se cultivaron en hipoxia. Para comprobar que la producción de ET-1 podía ser atribuida a las células glómicas de las neuroesferas, descartamos la presencia de células endoteliales maduras CD31+ en las mismas mediante citometría de flujo. En los histogramas 26 E y 26 F se observa que, mientras para CC dispersado en paralelo a las neuroesferas la expresión de CD31 fue, aproximadamente, del 28,21% (Figura 26 B), para las dos poblaciones de neuroesferas esta expresión no llegó en ningún caso al 0,5%, demostrando así que no había células endoteliales CD31+ en las neuroesferas que pudieran ser responsables de la producción de ET-1.

Para concluir nuestro análisis de la producción del factor en las células glómicas, recurrimos al ratón transgénico TH-EGFP. La separación de estas células por citometría de flujo utilizando la fluorescencia endógena de la GFP permitió la obtención de una población pura de células TH+ que efectivamente mostró expresión del gen Edn1 (Figura 26 I y J).

Estos resultados corroboran que el factor ET-1 es sintetizado por las células glómicas del CC, constituyendo la primera aproximación molecular realizada en células aisladas (McQueen et al., 1995; Paciga et al., 1999).

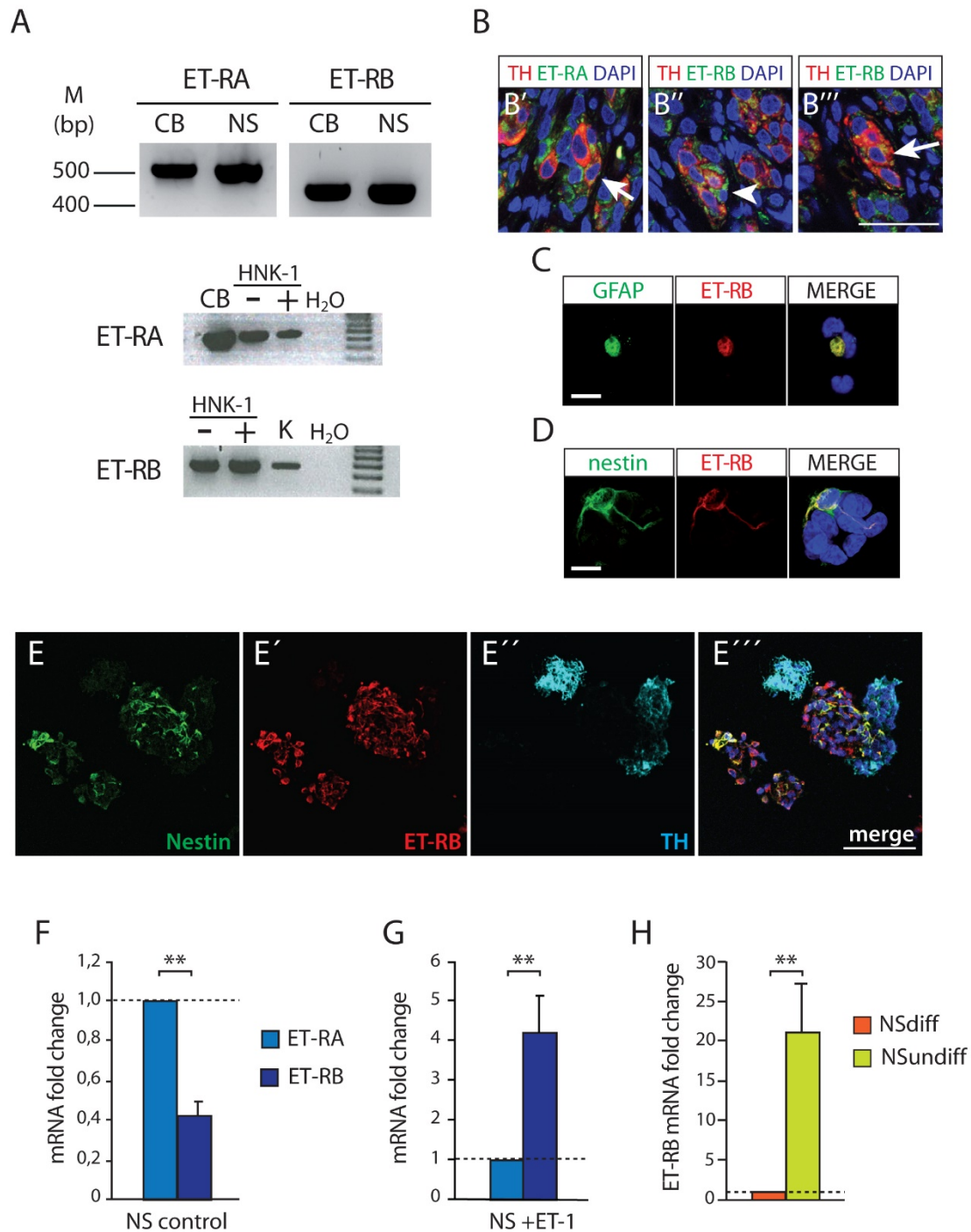
## 6.2 Expresión de los receptores de endotelina tipo A y tipo B

Tras caracterizar la producción de ET-1 en diferentes poblaciones del CC, se estudió la expresión de sus receptores (tipo A o ET-RA y tipo B o ET-RB), mediante técnicas moleculares e histológicas. La expresión del ARNm de los genes de ET-RA y ET-RB en CC completo, en células HNK-1+ y en NS se muestran en la figura 28 A. Todas las muestras resultaron expresar ambos receptores. En la figura 28 B se ilustran imágenes de inmunofluorescencia con anticuerpos frente a ET-RA y ET-RB en secciones de CC. Se puede observar cómo las células TH+ expresan tanto ET-RA como ET-RB (Figura 28, paneles B' y B''). En el panel B'' se muestra una célula TH-, con la morfología y las típicas prolongaciones de las células tipo II englobando un glomérulo y expresando el receptor tipo B (punta de flecha). Para completar el análisis, se llevó a cabo una cuantificación detallada de la expresión de los receptores en células de CC disperso. En la tabla 6 se indican los resultados de este análisis *ex vivo* (n=2 dispersiones). El 43% de las células totales de CC expresó ET-RA, frente al 17% que expresó ET-RB. Se observó también que el 100% de los progenitores GFAP+ y Nestina+ eran positivos para ET-RB, mientras que sólo una baja proporción expresaban el receptor tipo A, y además de forma débil. Las imágenes de la figura 28 C y D muestran la expresión del receptor B en células progenitoras GFAP+ o Nestina+. Contrariamente, las células glómicas expresaron en su totalidad ET-RA, y muy pocas ET-RB. Por tanto, nuestro estudio sugiere que los progenitores del CC expresan preferentemente el receptor tipo B mientras que las células glómicas expresan preferentemente el tipo A. Este dato fue corroborado en neuroesferas (Figura 28 E-E'''), donde las células que expresaban ET-RB (rojo) se encontraban homogéneamente distribuidas por el núcleo de la esfera, mientras que los *blebs* TH+ (cian) no presentaban tinción para el marcador ET-RB.

**Tabla 6. Expresión de los receptores de ET-1 en las células del cuerpo carotídeo.**

	ET-RA	ET-RB
<b>CC completo</b>	<b>43%</b>	<b>17%</b>
<b>Células GFAP+</b>	<b>39% (nivel bajo)</b>	<b>100%</b>
<b>Células Nestina+</b>	<b>7,7% (nivel bajo)</b>	<b>100%</b>
<b>Células TH+</b>	<b>100%</b>	<b>2,7%</b>

Además del análisis inmunocitoquímico de los receptores, se realizó un estudio de los niveles de expresión de ET-RA y ET-RB en neuroesferas mediante qRT-PCR. Las neuroesferas cultivadas en condiciones control expresaron mayormente ET-RA. Sin embargo, el cultivo de las neuroesferas en presencia de ET-1 indujo la expresión del receptor tipo B, llegando a valores cuatro veces superiores a los encontrados para el receptor A (Figura 28 F y G). Las neuroesferas enriquecidas en progenitores (NSundiff) mostraron también esta tendencia, presentando valores de expresión para ET-RB 20 veces superiores a los de las neuroesferas enriquecidas en células neuronales (NSdiff).



**Figura 28. Expresión de los receptores de ET-1 en el cuerpo carotídeo.** **A** RT-PCR en CC, neuroesferas y células HNK+ mostrando la expresión de ambos receptores. **B** Imágenes de confocal mostrando la detección de TH (en rojo) y de los receptores (en verde) en glomérulos de CC. ET-RA y ET-RB están expresados en células glómicas (flechas). Se muestra una célula sustentacular positiva para ET-RB (punta de flecha). **C** y **D** Inmunofluorescencias del receptor ET-RB en células GFAP+ y células Nestina+, dispersadas de CC completos. **E-E'''** Imágenes de confocal de secciones de neuroesferas teñidas con anticuerpos contra Nestina, ET-RB y TH. **F** y **G** qRT-PCR indicando los niveles de expresión de ET-RA y ET-RB en neuroesferas con y sin ET-1. **H** Sobreexpresión de ET-RB en la muestra NSundiff frente a NSdiff (n=3 cultivos). Barra de escala en B, 50  $\mu$ m; en C y D, 10  $\mu$ m; en E-E''', 100  $\mu$ m. Las barras de error indican SEM. \*\*p<0,01.

## 7 Papel de las células quimiosensoras en la proliferación del cuerpo carotídeo tras la exposición a hipoxia crónica

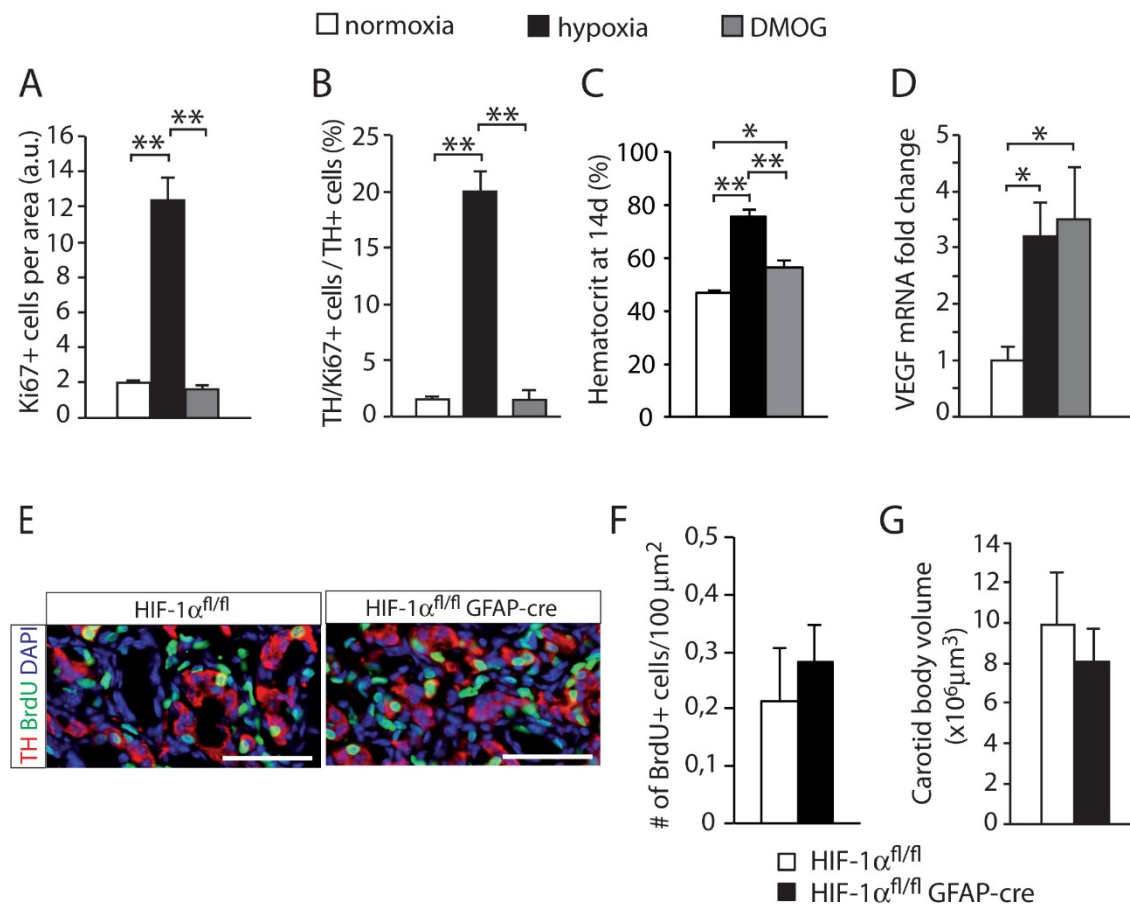
Los datos obtenidos en experimentos *in vitro*, relativos a la falta de efecto de la hipoxia sobre la proliferación de los progenitores del CC (ver apartado 3.2 de “*Resultados*”), junto con la organización morfológica celular que presentan los glomérulos, donde las células glómicas y los progenitores están físicamente relacionados, sugieren que podría existir una relación funcional entre las células madre del CC y las células glómicas quimiosensoras. En este apartado se describen los experimentos llevados a cabo para estudiar la relación existente entre ambos tipos celulares en el CC, y el posible control que las células glómicas maduras pueden ejercer sobre la activación de sus células progenitoras.

### 7.1 La estabilización de HIF no es el activador primario de la proliferación de las células madre del cuerpo carotídeo durante la exposición a hipoxia crónica

Los experimentos realizados sobre el crecimiento de las neuroesferas de CC en presencia de diferentes concentraciones de O<sub>2</sub> (apartado 3.2) han demostrado que las CMCC en cultivo no detectan por sí mismas la bajada de oxígeno. Para confirmar estos resultados y extrapolarlos al CC *in vivo* se llevó a cabo la estabilización farmacológica de HIF, uno de los efectores más importantes de la hipoxia. Los experimentos se realizaron mediante la administración a ratas de dimetiloxalilglicina (DMOG), un compuesto que mimetiza la hipoxia, ya que estabiliza HIF en condiciones de normoxia mediante la inhibición inespecífica de las prolin-hidroxilasas (PHD). En la figura 29 A y B se muestra que el DMOG no consiguió activar la proliferación en el CC tras 3 días de tratamiento como sí lo hizo el estímulo hipóxico. Sin embargo, los datos de los gráficos 29 C y 29 D reflejan que la administración del fármaco fue efectiva, ya que produjo un efecto activador en dos de sus genes dianas, VEGF y EPO. Este último se analizó mediante el nivel de hematocrito (75,48 % en animales hipóxicos, 56,1 % en animales con DMOG y 45,25 % en animales en normoxia).

Además del método farmacológico con DMOG, estudiamos el comportamiento de los CC de ratones *knock-out* condicionales (KO) GFAP-HIF1 $\alpha$  que tenían abolido el gen HIF1 $\alpha$  específicamente en las células GFAP+. En la figura 29 E se muestran secciones de tejido de CC de ratones silvestres y KO marcadas con BrdU y TH. El BrdU se administró una vez a la semana mediante inyección intraperitoneal y en el agua de bebida durante los 19 días de tratamiento. Las figuras 29 F y G indican que los animales KO experimentaron la misma respuesta a la hipoxia crónica que los animales silvestres. Estos ensayos nos permitieron concluir que el inicio de la proliferación en el CC no depende de la hipoxia directamente, tanto *in vitro* como *in vivo*, y que la vía HIF no parece estar implicada en dicho proceso de activación proliferativa de los progenitores.





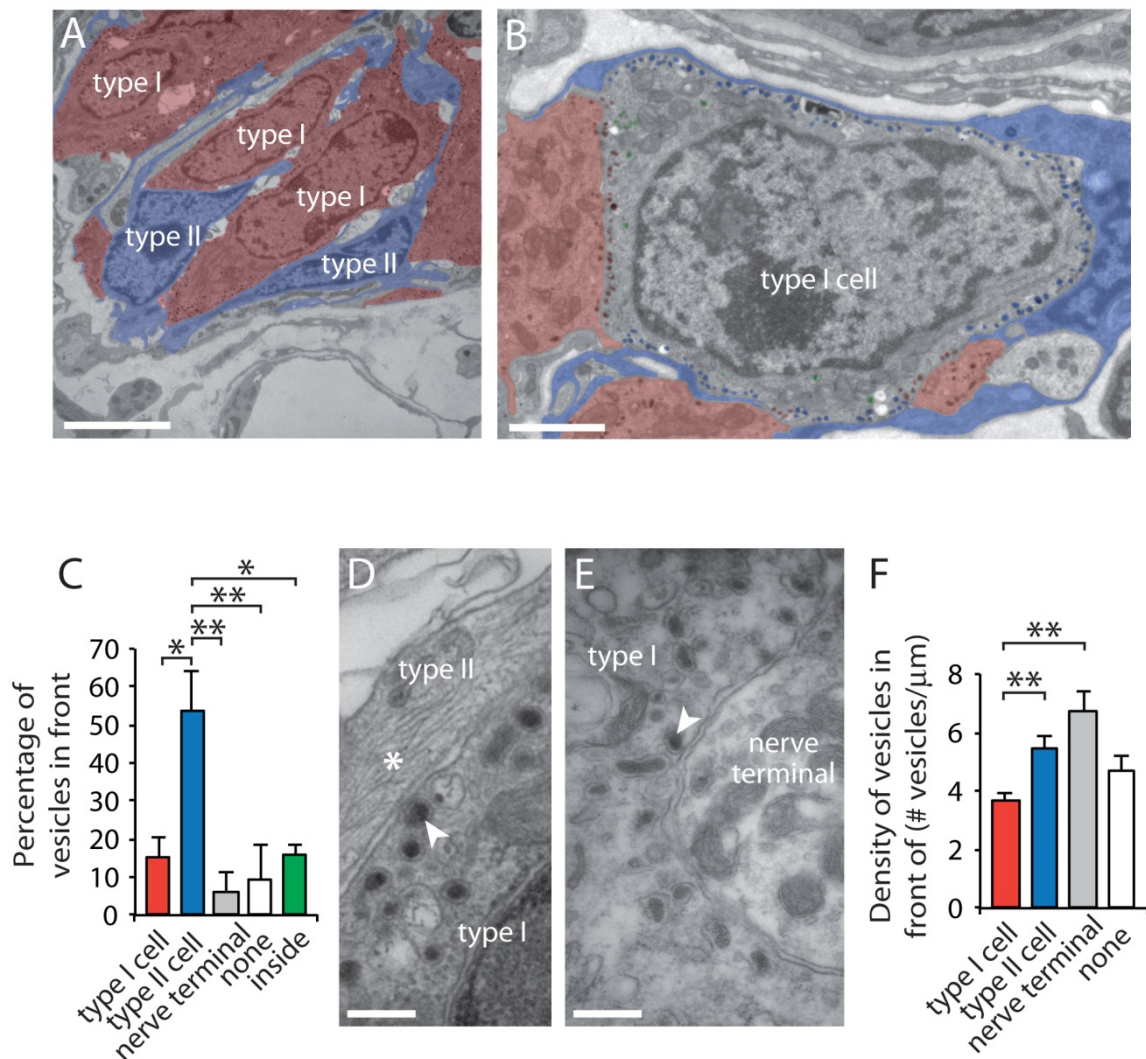
**Figura 29. Participación de la estabilización de HIF en el crecimiento del cuerpo carotídeo.** **A** y **B** Cuantificación de la densidad de las células Ki67+ en el parénquima de CC de ratas expuestas a normoxia, hipoxia (10% O<sub>2</sub>) o DMOG (80 mg/Kg), durante 3 días. El DMOG no aumentó la proliferación celular en el CC a pesar de la inducción de genes de HIF-dependientes (n=3 ratas por grupo). **C** Cuantificación del hematocrito en ratas expuestas a normoxia (21% O<sub>2</sub>), hipoxia (10% O<sub>2</sub>), o tratadas con DMOG (21% O<sub>2</sub>), durante 14 días. La inhibición de las prolil-hidroxilasas con DMOG aumenta el hematocrito, aunque en menor medida que la hipoxia. **D** qRT-PCR que muestra la sobre-expresión de VEGF, un gen diana de HIF, en el cerebro de ratas expuestas a normoxia, hipoxia o tratadas con DMOG durante 3 días. **E** Inmunohistoquímica de BrdU y TH en los CC de ratones GFAP-HIF1 $\alpha$  y ratones silvestres expuestos a Hx (10% O<sub>2</sub>) durante 19 días. **F** y **G** Análisis del número de células BrdU+ (F) y del volumen de CC (G) en ratones GFAP-HIF1 $\alpha$  y ratones silvestres expuestos a hipoxia crónica (5 CC de tres ratones mutantes y 3 CC de dos ratones silvestres). Barra de escala en E, 50  $\mu$ m. Las barras de error indican SEM. \*p<0,05, \*\*p<0,01.



## 7.2 Estudio morfológico del nicho neurogénico del cuerpo carotídeo; sinapsis célula glómica-célula madre

Para estudiar con detalle las relaciones estructurales entre las células glómicas y las células sustentaculares se realizaron estudios de microscopía electrónica. La figura 30 A muestra cómo las células sustentaculares (en azul) emiten unas largas prolongaciones que envuelven y rodean a las células glómicas (en rojo) en los glomérulos. Se encontró que ambos tipos de células eran claramente distinguibles por su morfología. Las células glómicas mostraban un citoplasma grande y con abundantes mitocondrias, un retículo endoplásmico desarrollado, y numerosas vesículas secretoras. Una propiedad de estas células es que sus vesículas no se concentran en áreas determinadas, como los sitios activos de otras neuronas, sino que se distribuyen a lo largo de toda la membrana. Las células sustentaculares se caracterizaban por un núcleo fusiforme, grandes nucléolos, citoplasma perinuclear escaso y con pocas mitocondrias, y ausencia de vesículas secretoras.

Un análisis cuantitativo de la cantidad de vesículas situadas enfrente de las distintas membranas celulares que rodean a las células glómicas mostró que la gran mayoría de las vesículas se disponían frente a las células sustentaculares (tipo II) (Figura 30 B y C). Incluso la densidad de los gránulos secretores de las diferentes regiones "presinápticas" de las células glómicas fue prácticamente la misma cuando la membrana "postsináptica" era un terminal nervioso o una célula tipo II (Figura 30 F). En la imagen 30 D puede apreciarse la distancia mínima entre las membranas de las células tipo I y tipo II, que era generalmente menor de 50 nm, muy similar al espacio sináptico entre las células glómicas y los terminales nerviosos (Figura 30 E). Esta arquitectura de los glomérulos hace muy probable que los neurotransmisores y factores liberados por las células glómicas en respuesta a hipoxia no solo activen a las fibras aferentes, sino que también modulen las funciones de otros elementos postsinápticos como las células sustentaculares, formando una estructura tipo sinapsis entre la célula madre y la célula glómica.



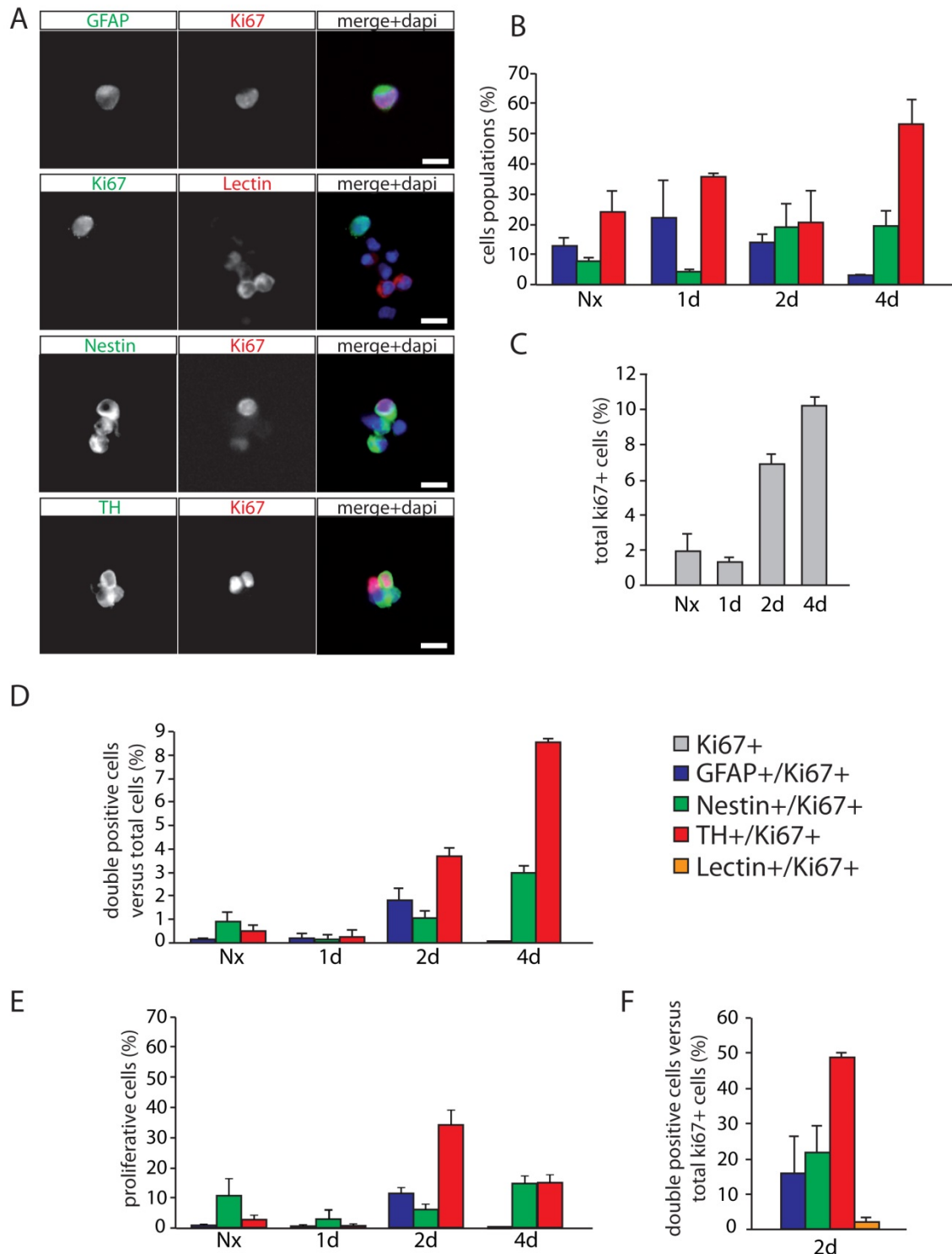
**Figura 30. Contactos “sinápticos” entre las células neuronales tipo I y las células gliales tipo II en el parénquima del cuerpo carotídeo.** **A** Micrografía electrónica pseudocoloreada de una sección de CC ultrafina de un animal normóxico, que muestra la estrecha asociación de las células progenitoras tipo II con las células neuronales tipo I. **B** Imagen que ilustra los elementos celulares que rodean una típica célula tipo I en el parénquima de CC. Las células de tipo II y las vesículas enfrentadas a éstas aparecen en azul; las células tipo I y las vesículas que se enfrentan a otra célula tipo I aparecen en rojo; las vesículas lejos de la membrana (“inside” en la gráfica C), aparecen en verde. **C** Cuantificación del porcentaje de vesículas de las células tipo I frente a cada uno de los diferentes elementos celulares que rodean a una célula tipo I típica. **D** y **E** Micrografías electrónicas que muestran detalles de la zona de contacto entre una célula tipo I y una célula tipo II (D), y entre una célula tipo I y un terminal nervioso (E). Las flechas indican ejemplos de vesículas de exocitosis cerca de la membrana plasmática. El asterisco señala un haz de filamentos intermedios característicos de las células tipo II. **F** Cuantificación de la densidad de vesículas de núcleo denso por unidad de longitud de la membrana celular frente a los diferentes elementos celulares. La densidad es significativamente mayor cuando una célula tipo II o un terminal nervioso aparecen como membrana “postsináptica”. Barra de escala en A, 5 μm; en B, 2 μm; en D y E, 0,2 μm. Las barras de error indican SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

### 7.3 Las células implicadas en la sinapsis son las primeras en activarse en hipoxia crónica

Conocer la dinámica de activación de las distintas poblaciones que conforman el CC podría ayudar a entender mejor el proceso que tiene lugar en el órgano en respuesta al estímulo hipóxico. En este estudio se persiguió averiguar qué tipos celulares respondían de forma más rápida al descenso de la  $PO_2$ , activando su proliferación. En la figura 31 A se muestran diferentes poblaciones celulares del CC identificadas con distintos marcadores, GFAP y Nestina para los progenitores, TH para las células glómicas, y Lectina para las células endoteliales, colocalizando, además, con el marcador de proliferación Ki67. El gráfico 31 B muestra las cuantificaciones de las distintas poblaciones de células dispersas de CC de ratas sometidas a distintos días de hipoxia. Nótese que las células GFAP+ comienzan a desaparecer tras los primeros días de hipoxia, como ya se observó en estudios previos con células de ratón (Pardal y col., 2007), al mismo tiempo que aumentan las células Nestina+. Este fenómeno hace referencia a que GFAP es un marcador de progenitor quiescente, que cuando se activa adquiere un fenotipo proliferativo que expresa el marcador Nestina, de forma similar a como ocurre en los progenitores del nicho neurogénico de la SVZ (Doetsch, 2003a).

La proliferación en el CC, analizada mediante la expresión de Ki67, incrementó a partir del día 2 de exposición a hipoxia, aunque existía división celular basal muy escasa en normoxia y a día 1 de tratamiento (Figura 31 C). En el gráfico 31 D se expone la dinámica de proliferación ocurrida en los distintos tipos celulares del CC durante hipoxia. Los progenitores GFAP+ experimentan un pico de activación a los dos días de exposición a hipoxia, que prácticamente desaparece a día 4. Sin embargo, los progenitores Nestina+ y las células glómicas TH+ manifiestan una proliferación prolongada a partir del segundo día de hipoxia, que continúa aumentando a día 4. La población de células endoteliales Lectina+ no presentó expresión de Ki67 en los días analizados (Figura 31 F), sugiriendo que las primeras células del CC en activarse son aquellas implicadas en la “sinapsis” formada entre los progenitores y las células glómicas.

En el gráfico E aparece reflejado el porcentaje de proliferación referido a cada tipo celular. Curiosamente, a día 2 de hipoxia el 40 % de las células glómicas se encuentran proliferando. Sin embargo, este porcentaje disminuye a la mitad en el día 4, cuando el número total de células TH aumenta hasta el 50%, sugiriendo que la proliferación de las células glómicas no es homogénea durante todo el proceso de crecimiento del órgano.

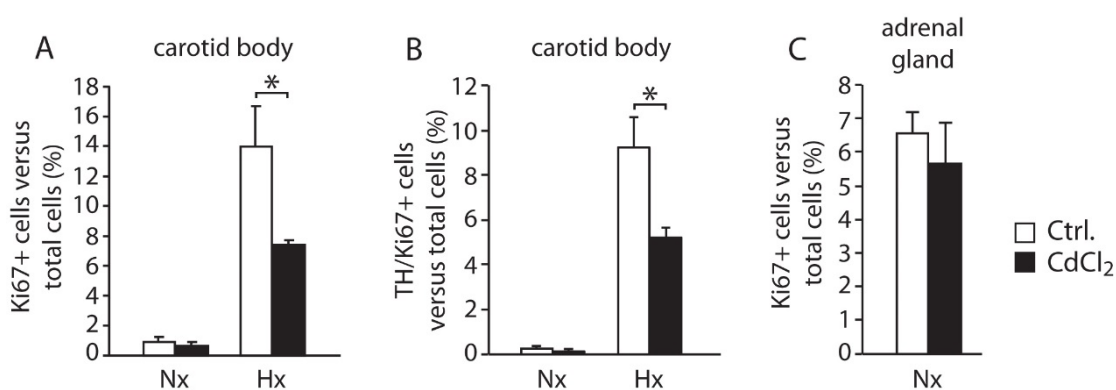


**Figura 31. Dinámica proliferativa de las distintas poblaciones celulares del cuerpo carotídeo durante la exposición a hipoxia.** **A** Imágenes de fluorescencia de células disociadas de CC de animales expuestos a hipoxia (10% O<sub>2</sub>). La identificación de la proliferación de células se realiza con el marcador Ki67 y su colocación con los diferentes marcadores celulares del CC: GFAP (células madre); Lectina (células endoteliales); Nestina (progenitores neurales); y TH (células glómicas). Barra de escala, 10  $\mu$ m. **B** diagrama que ilustra el porcentaje de las distintas poblaciones del CC a diferentes tiempos de hipoxia. **C** Proliferación total en el CC a lo largo de los primeros cuatro días de hipoxia. **D** Proliferación en las distintas poblaciones celulares normalizada por el total de células en hipoxia. Se observa que a día 2, la población de células GFAP+ proliferando corresponde a casi el 2 % del total de células del CC. **E** Células proliferando dentro de cada población. A día 2 de hipoxia, el 13 % de las células GFAP+ están proliferando. **F** Distribución de la proliferación total del órgano entre los distintos tipos celulares. Las barras de error indican SEM.

## 7.4 El bloqueo de la liberación de vesículas de las células glómicas frena la activación proliferativa en el cuerpo carotídeo

En los apartados anteriores se han mostrado resultados que sugieren que las células glómicas se encuentran formando estructuras sinápticas con los progenitores neurales, y que ambos tipos celulares se activan rápidamente con un estímulo hipóxico sostenido. Con el fin de demostrar que las células glómicas son los elementos que disparan la salida de la quiescencia de las CMCC, se procedió a inhibir la secreción de las vesículas sinápticas en dichas células mediante dos aproximaciones: bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  por Cadmio y utilización de un modelo genético de ratón con células glómicas no funcionales.

Las células glómicas responden a hipoxia con un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , necesario para activar la liberación de los neurotransmisores. Este proceso puede ser inhibido *in vitro* por el bloqueo de los canales de calcio con  $\text{Cd}^{2+}$  (Urena et al., 1994; Buttigieg and Nurse, 2004). Para estudiar el papel de la secreción de neurotransmisores *in vivo*, se administró cloruro de cadmio en ratas sometidas a normoxia o hipoxia crónica durante dos días. La figura 32 A muestra la proliferación ocurrida en el CC de los animales tratados con  $\text{CdCl}_2$  en normoxia e hipoxia. El  $\text{Cd}^{2+}$  disminuyó la proliferación en respuesta a hipoxia del órgano analizada mediante el marcador Ki67. El compuesto también redujo la proliferación de la población TH+ (Figura 32 B). Sin embargo, la dosis de  $\text{Cd}^{2+}$  administrada no afectó a la proliferación de otros tejidos como intestino o glándula adrenal, descartando efectos tóxicos del metal (Figura 32 C).



**Figura 32. Inhibición farmacológica de la liberación de vesículas.** **A** Cuantificación de células proliferativas (Ki67+) en la población total de células disociadas de CC de ratas expuestas a 2 días de Nx (n=6) o Hx (10 %  $\text{O}_2$ , n=7), con o sin inyección intraperitoneal de cadmio. **B** El cadmio reduce el aumento en la proliferación de las células TH+ provocado por la hipoxia. **C** Proliferación en un tejido control. Las barras de error indican SEM. \*p<0,05.

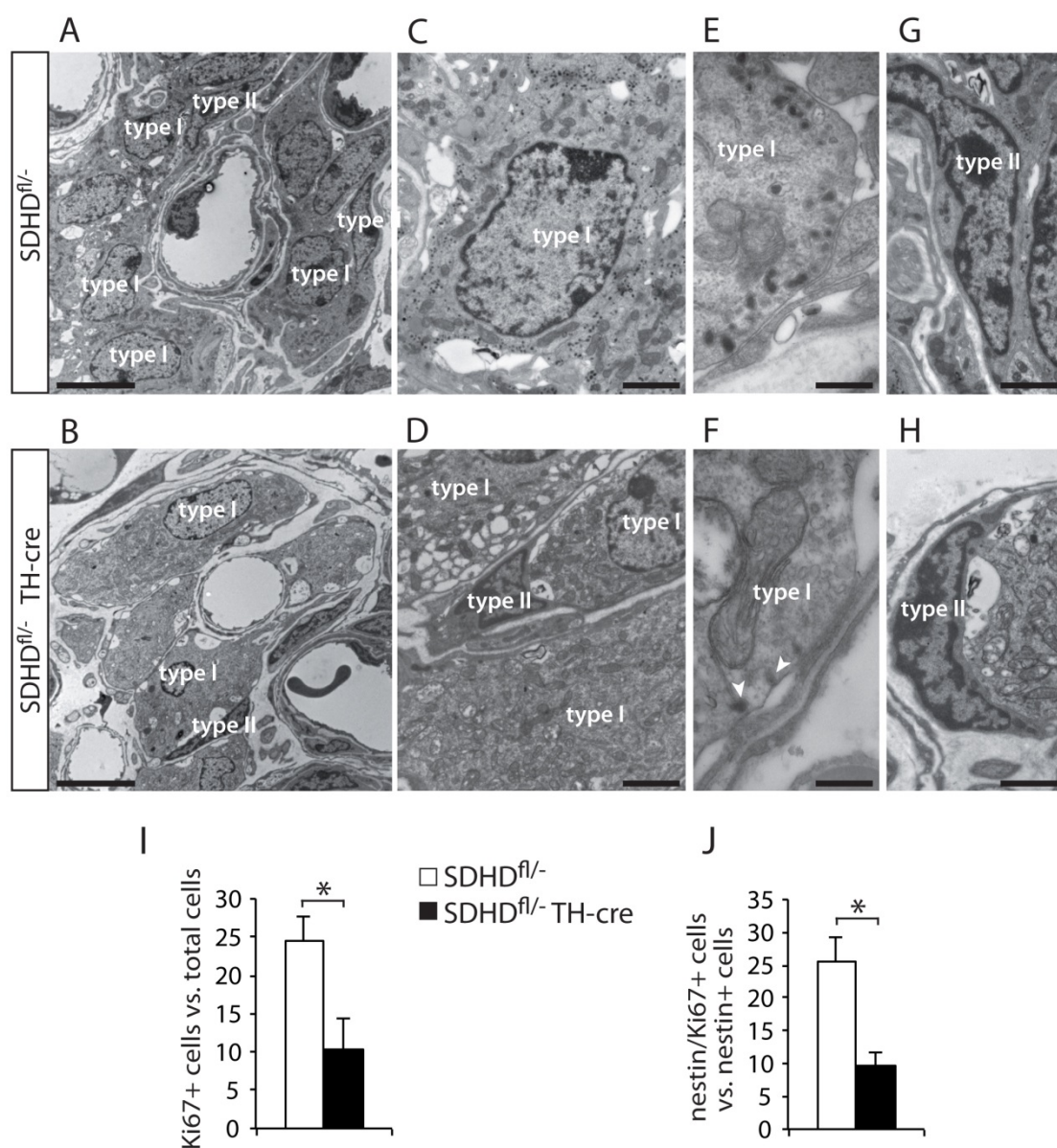


La función esencial que desempeñan las células glómicas en el desencadenamiento del crecimiento del parénquima neural del CC en hipoxia fue confirmada también por experimentos realizados con ratones knock-out condicionales TH-SDHD generados en nuestro laboratorio. Estos animales pierden la subunidad “D” del complejo II mitocondrial en las células TH+, dando lugar a la pérdida de células catecolaminérgicas en el CC y en otros tejidos como la sustancia negra del mesencéfalo (Díaz-Castro et al.). La figura 33 muestra imágenes de microscopía electrónica del CC de los animales TH-SDHD, donde se demuestra que las células glómicas se encontraban en estado de degeneración (Figura 33 A-F). Estas células mutantes presentaban agrandamiento del citoplasma, incremento en el número de mitocondrias, y existencia de vacuolas y vesículas vacías (Figura 33 D). El número de vesículas secretoras en estas células (Figura 33 D y F) estaba marcadamente disminuido comparado con los ratones control (Figura 33 C y E). Sin embargo, ya que la mutación estaba restringida a las células expresando TH, las células tipo II, los progenitores neurales quiescentes, no mostraban signos anormales y aparecían con sus característicos largos procesos citoplasmáticos rodeando los glomérulos de células tipo I, tal y como se aprecia en las imágenes G y H. Estos animales transgénicos, con células glómicas no funcionales y células progenitoras aparentemente normales, constituían un modelo *in vivo* ideal para estudiar la comunicación, a través de la secreción de vesículas, entre ambos tipos celulares.

Los diagramas de la figura 33 I y J muestran la cuantificación de la proliferación en el CC de los animales TH-SDHD. Los animales transgénicos se desarrollaron normalmente en normoxia (Díaz-Castro et al.), pero morían a las pocas horas de someterlos a una hipoxia del 10% de O<sub>2</sub>, debido posiblemente a la incapacidad de aclimatación a este estímulo por la pérdida de funcionalidad de las células tipo I. Sin embargo, los animales sobrevivieron al 14% de O<sub>2</sub> más de una semana sin aparentes síntomas de estrés. La proliferación en los CC de los ratones transgénicos, analizada mediante Ki67, se vio significativamente reducida comparada con los ratones silvestres (Figura 33 I). Específicamente los progenitores Nestina+ también mostraron una disminución en la proliferación (Figura 33 J).

El resultado obtenido con los cuerpos carotídeos desprovistos de células glómicas funcionales de los ratones TH-SDHD, junto con el experimento del bloqueante de los canales de Ca<sup>2+</sup> que previene la liberación de vesículas desde las células glómicas, proporcionaron una fuerte evidencia de que la activación de las células glómicas es el paso inicial que induce el crecimiento del parénquima neural del CC bajo hipoxia crónica.





**Figura 33. Alteración genética de la función de las células tipo I.** **A** Micrografía electrónica que muestra el parénquima neural de un CC en un ratón control para ilustrar el aspecto normal de las células tipo II y tipo I. **B** Micrografía electrónica que muestra el parénquima neural de un CC de un ratón mutante TH-SDHD, para ilustrar la apariencia anormal de las células tipo I, las cuales presentan menor tamaño de núcleo y un citoplasma agrandado. **C** Detalle de una célula tipo I en el CC de un ratón control que contiene numerosas vesículas de núcleo denso. **D** Detalle de una célula tipo I en un ratón mutante. Estas células muestran un aumento del número de mitocondrias y casi no presentan vesículas de núcleo denso. La célula tipo I en la parte superior izquierda de la imagen también contienen numerosas vacuolas. **E** Detalle de vesículas de núcleo denso dentro del citoplasma de una célula tipo I en el CC de un ratón control. **F** Detalle del citoplasma de una célula tipo I de un ratón TH-SDHD, en el que la disfunción mitocondrial dio lugar a una marcada disminución en el número de vesículas secretoras. Las puntas de flecha indican dos vesículas presentes en este campo. **G** Detalle de una típica célula tipo II en el tejido nervioso del CC de un ratón control. **H** Disposición y aspecto normal de una célula tipo II que rodea una célula tipo I en el parénquima neural del CC de un ratón mutante. **I** y **J** Cuantificación de células Ki67+ (**I**) o Nestina/Ki67 dobles positivas (**J**) frente a células totales disociadas de CC de ratones control (n=4) o ratones TH-SDHD (n=3), expuestos a Hx (14% O<sub>2</sub>) durante 6 días. Barras de escala en A y B, 5 µm; en C y D, 2 µm; en E y F, 0,5 µm; en G y H, 2 µm. Las barras de error expresan SEM. \*p<0,05.

## 8 Vías moleculares implicadas en la proliferación y diferenciación de los progenitores del cuerpo carotídeo

Las células madre del cuerpo carotídeo (CMCC) han sido descritas e identificadas recientemente como las células sustentaculares o tipo II de este órgano (Pardal et al., 2007). Se conoce muy poco acerca del fenotipo molecular de este tipo celular, al que clásicamente se le había atribuido una mera función de sostén y acompañamiento de las células quimiorreceptoras tipo I. Tras el descubrimiento de esta población de progenitores, el interés por estudiar dichas células llevó a nuestro grupo a intentar encontrar marcadores específicos que permitieran su aislamiento, y, de este modo, poder realizar análisis moleculares de expresión génica. Hasta la fecha, no se cuenta con marcadores que permitan un aislamiento prospectivo de las células tipo II. Se ha intentado el uso de ratones transgénicos que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor GFAP, proteína característica de las células tipo II. Sin embargo, la técnica no ha dado los resultados esperados debido a la labilidad de la GFP y a la escasez de células tipo II en ratones. Debido a estas limitaciones se ha llevado a cabo un acercamiento al propósito de analizar la expresión génica de las células tipo II mediante la utilización de neuroesferas de CC. Como se ha descrito previamente en este trabajo, las neuroesferas están formadas por una esfera de progenitores rodeada de pequeños glomérulos de células neuronales. La proporción de la región ocupada por los progenitores y la región ocupada por células neuronales puede ser modificada usando diferentes condiciones de cultivo. La aproximación propuesta consideró usar una población de neuroesferas enriquecidas en la región progenitora y comparar su expresión génica con una población de neuroesferas enriquecidas en la población dopaminérgica. Aunque este análisis no contaba con poblaciones celulares purificadas, podía aportar información valiosa para el estudio de los progenitores del CC y la búsqueda de marcadores que permitieran la separación de estas células en ratas, donde su presencia es más abundante que en ratón.

### 8.1 Obtención de neuroesferas de cuerpo carotídeo enriquecidas en progenitores y neuroesferas enriquecidas en células neuronales

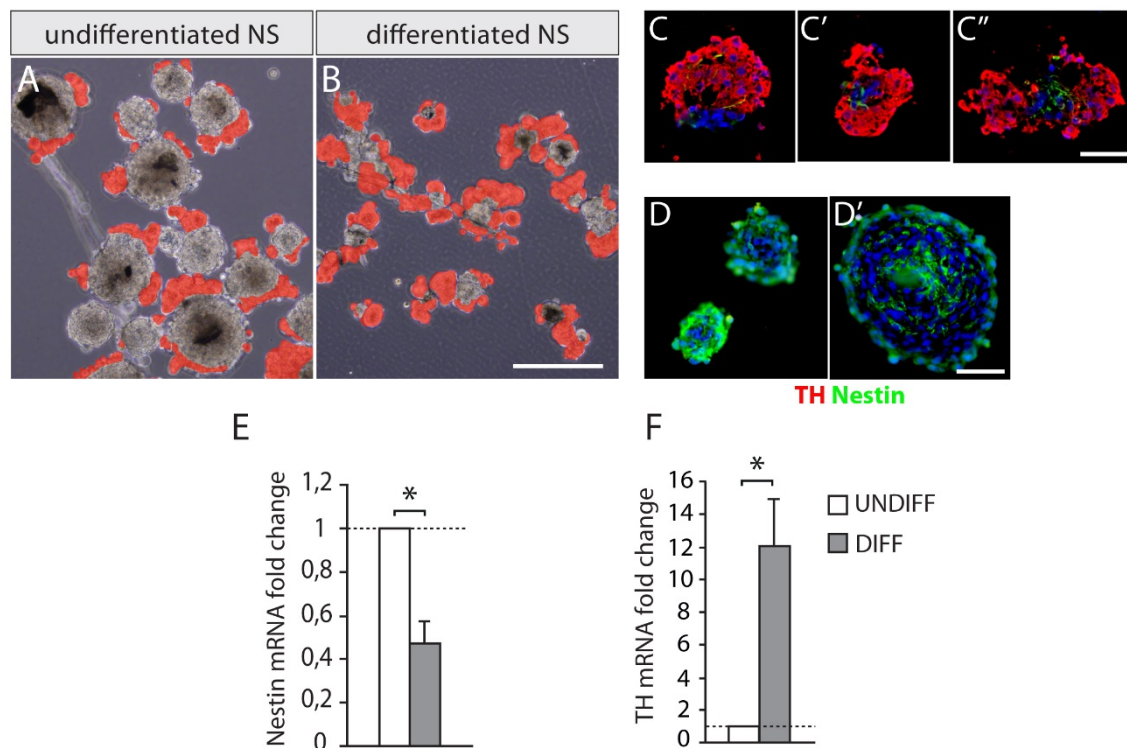
Para la obtención de neuroesferas ricas en progenitores y neuroesferas ricas en células glómicas se utilizaron los conocimientos adquiridos durante este trabajo sobre los efectos de diferentes factores en el cultivo de progenitores de CC. Anteriormente, se ha mostrado el efecto sobre la diferenciación dopaminérgica de factores como los mitógenos IGF-1, FGF-2 y EGF, la hipoxia, o el péptido ET-1. Se utilizaron combinaciones de estos factores para obtener diferentes tipos de neuroesferas. Las neuroesferas enriquecidas en progenitores, a las que llamamos *NSundiff*, se obtuvieron mediante el cultivo de células del CC en condiciones de normoxia en *medio completo* (con mitógenos), al que se le añadió ET-1. A este medio se le llamó *medio de proliferación*. Las neuroesferas enriquecidas en células neuronales o *NSdiff*, se consiguieron mediante el cultivo en *medio de diferenciación* (sin mitógenos y sin ET-1), y en condiciones de hipoxia al 3% de O<sub>2</sub> (ver sección 2.1 de *Materiales y Métodos*). Las figuras 34 A y B muestran los cultivos de ambos tipos de neuroesferas en los que los *blebs* han sido pseudocoloreados en rojo para apreciar mejor las diferencias. Tras 13 días de cultivo en los respectivos medios, se obtuvieron, por un lado, neuroesferas de gran tamaño y muy redondeadas casi carentes de *blebs* (Figura 34 A), y por otro lado, neuroesferas muy pequeñas, sin

apenas un núcleo bien formado, y con numerosos abultamientos que correspondían a los típicos *blebs* de células neuronales (Figura 34 B). En los paneles C-C'' se observan diferentes ejemplos de NSdiff enriquecidas en células neuronales, y en D-D', NSundiff, teñidas ambas con los marcadores Nestina y TH, para identificar progenitores y células neuronales, respectivamente. Se analizó también la expresión de los genes Nestina y TH por qRT-PCR y se comprobó que las NSundiff tenían incrementado su nivel de Nestina y disminuida la expresión de TH frente a las NSdiff (Figura 34 E y F). Estos resultados confirman que la combinación de los factores PO<sub>2</sub>, mitógenos y ET-1 es capaz de modificar el destino celular de los progenitores del CC.

## 8.2 Expresión diferencial de genes entre progenitores y células neuronales del cuerpo carotídeo

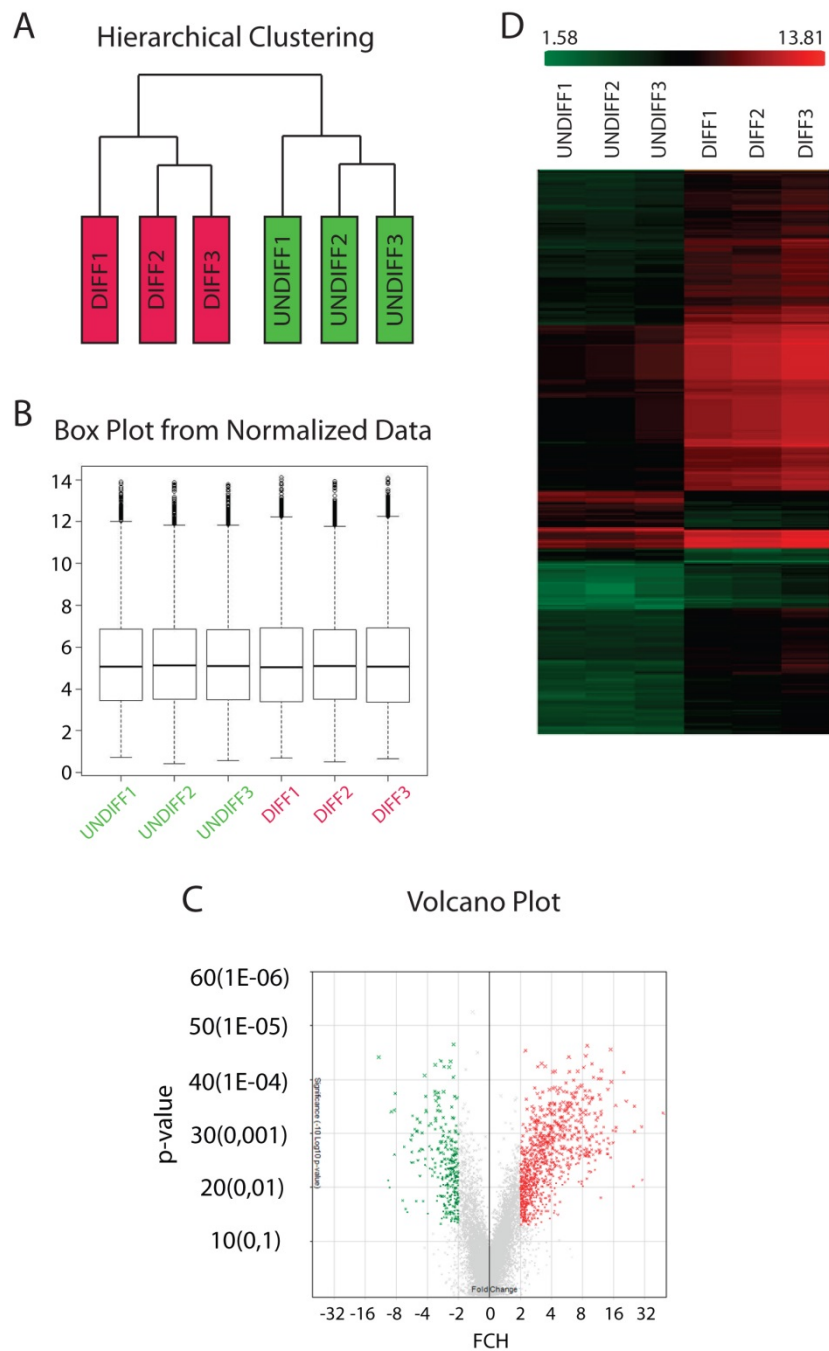
Una vez obtenidas las NSundiff y las NSdiff, se procedió a realizar un análisis de expresión mediante microarrays de Affymetrix utilizando el 'GeneChip Rat Gene ST 1.0 Array', el cual permite el estudio de un número estimado de 27.342 genes bien descritos y anotados. Se sometieron a análisis 3 muestras de NSdiff y 3 muestras de NSundiff, que mostraron tener la concentración y pureza de ARN necesarias para dichos experimentos. En la figura 35 A se observa que el análisis de expresión génica distribuía las muestras en dos grupos, que coincidían con las poblaciones indiferenciadas y diferenciadas, lo cual demostró que las condiciones de cultivo aplicadas a las células de CC habían logrado dos poblaciones realmente diferentes de células. Mediante el *Volcano Plot* de la figura 35 C podemos observar la distribución de los genes de los microarrays ordenados según su valor de expresión (*eje x*) y significancia (*eje y*). En este tipo de representación la región de interés la forman los puntos con valor más alto en el *eje y*, y que están más lejos a la derecha o a la izquierda del punto 0 en el *eje x*, es decir, aquellos con un cambio más alto en la expresión génica y con mayor significancia. Los resultados del estudio revelaron cambios de expresión en 1.554 genes, cuando se aplicaban unos valores de *Fold Change* (FCH)  $\geq 2$  y FDR (p-value ajustada)  $< 0,01$ . De entre estos genes, 1.019 genes estaban sobreexpresados en la población de NSdiff y 535 genes estaban sobreexpresados en la población de NSundiff. Los valores empleados para los parámetros de FCH y FDR son restrictivos y proporcionan genes con cambios importantes en expresión y altamente significativos.

Como primera comprobación de la fiabilidad del análisis se examinaron genes típicos de diferenciación y proliferación en ambas poblaciones de neuroesferas. Entre los genes expresados en el grupo NSdiff encontramos 'dopa decarboxylase' (Ddc), 'tyrosine hydroxylase' (Th), 'adenosine A2a receptor' (Adora2a) o 'dopamine receptor D2', confirmando el carácter diferenciado neuronal de estas neuroesferas. Por su parte, el grupo NSundiff expresaba genes como 'epidermal growth factor receptor' (Egfr), 'semaphorin 3A' (Sema3A), 'myelocytomatosis oncogene' (Myc), 'platelet-derived growth factor alpha polypeptide' (Pdgfa) y 'wingless-type MMTV integration site family 5A' (Wnt5a), todos ellos asociados a proliferación e indiferenciación. Estos genes nos indicaron que las dos poblaciones de células habían sido seleccionadas correctamente, pues las neuroesferas enriquecidas en células neuronales expresaban genes relacionados con diferenciación neuronal y sistema nervioso, y las neuroesferas enriquecidas en progenitores expresaban genes relacionados con pluripotencia y células madre. En la tabla 7 podemos encontrar 12 genes elegidos para realizar un perfil de identidad de cada población.



**Figura 34. Caracterización de las poblaciones NSdiff y NSundiff.** **A** y **B** Fotos de campo claro de cultivos de ambos tipos de neuroesferas mostrando la diferente abundancia de *blebs* (pseudocoloreados en rojo). **C** y **D** Imágenes de fluorescencia de NSdiff y NSundiff marcadas con TH (en rojo) y Nestina (en verde). La tinción Nestina casi está ausente en las NSdiff y la tinción TH está prácticamente ausente en las NSundiff. **E** y **F** qRT-PCR mostrando las diferencias de expresión en los marcadores Nestina, para indiferenciación, y TH, para diferenciación entre NSdiff y NSundiff. Barras de escala en A y B, 200  $\mu$ m; en C y D 50  $\mu$ m. Las barras de error expresan SEM. \* $p < 0,05$ .





**Figura 35. Controles de calidad del estudio de microarrays.** **A** Agrupación jerárquica de las muestras utilizadas en el estudio. Las muestras de una misma población están relacionadas consigo mismas de forma más inmediata que con las de otra población. **B** Diagrama de cajas de los datos normalizados. **C** Gráfico que muestra todos los genes analizados de cada población según su *p-value* y FCH. **D** Mapa de calor que proporciona una visión general de los niveles de expresión en cada muestra.

Tabla 7. Perfil de identidad de las NSdiff y de las NSundiff

DIFFERENTIATED NEUROSPHERES			UNDIFFERENTIATED NEUROSPHERES		
name	symbol	FCH	name	symbol	FCH
dopa decarboxylase	Ddc	9,49	epidermal growth factor receptor	Egfr	2,07
tyrosine hydroxylase	Th	7,24	Fibroblast growth factor receptor 1	Fgfr1	2,03
adenosine A2a receptor	Adora2a	10,12	semaphorin 3A	Sema3a	3,28
neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	Nbl1	8,34	myelocytomatosis oncogene	Myc	2,03
enolase 2, gamma, neuronal	Eno2	4,26	wingless-type MMTV integration site family, 5A	Wnt5a	2,22
purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12	P2ry12	10,45	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	Pdgfa	2,12
dopamine receptor D2	Drd2	5,95	platelet derived growth factor receptor, alpha	Pdgfra	2,76
neuronatin	Nnat	15,20	platelet derived growth factor C	Pdgfc	3,09
neuronal pentraxin 2	Nptx2	13,52	transforming growth factor, beta receptor II	Tgfbr2	2,16
secretogranin III	Scg3	11,69	frizzled homolog 1 (Drosophila)	Fzd1	2,59
neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	Ntrk2	6,88	frizzled homolog 2 (Drosophila)	Fzd2	2,43
synaptophysin	Syp	6,23	sphingosine kinase 1	Sphk1	2,13



### 8.3 Validación del estudio de microarrays

Las diferencias en expresión de genes obtenidas de los microarrays fueron validadas por qRT-PCR mediante el uso de '*Custom TaqMan Array Plates*' (Applied Biosystem). De los 44 genes seleccionados para qRT-PCR, todos los genes fueron confirmados como diferencialmente expresados, garantizando la validez de los datos de los microarrays (Figura 36, Tabla 8).

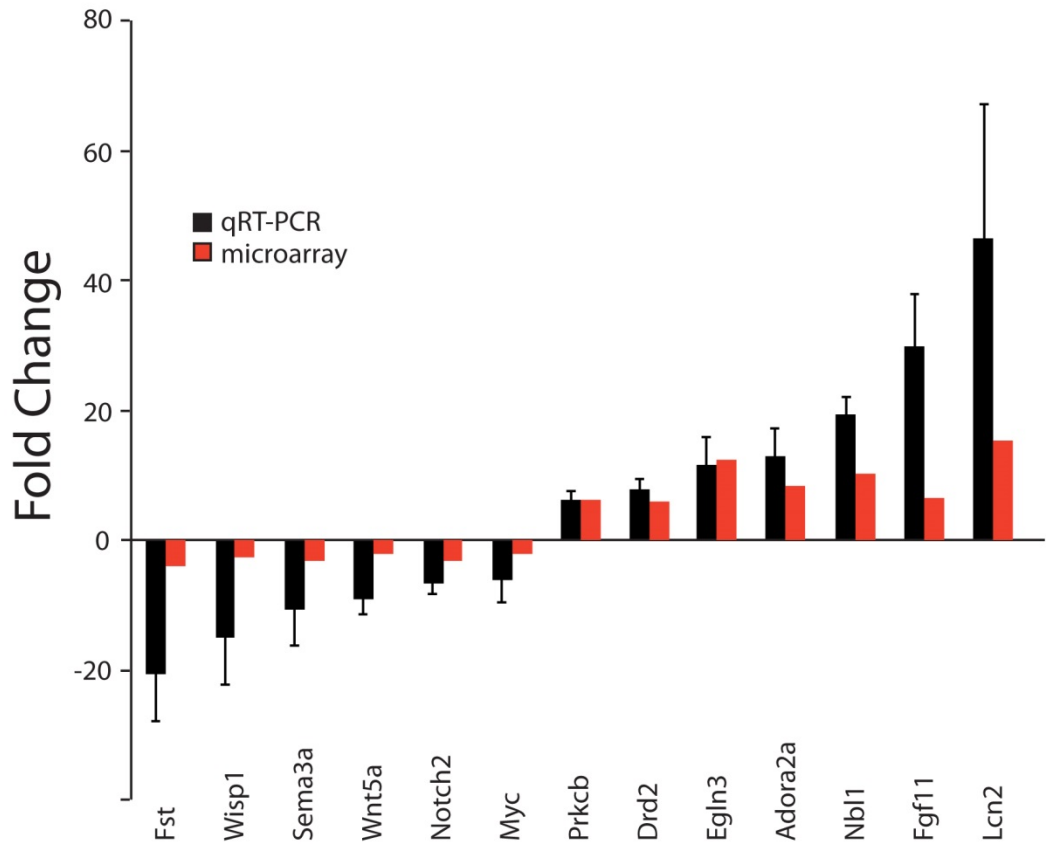


Figura 36. Niveles de expresión de genes seleccionados para la validación por qRT-PCR.

**Tabla 8. Expresiones de genes seleccionados para validación por qRT-PCR.**

GENE	FCH qPCR	FCH array	GENE	FCH qPCR	FCH array
Tnn	-43,08	-10,29	Pdgfra	-6,65	-2,76
Ednrb	-21,04	-4,56	Itgb3	-10,65	-4,47
Fgf7	-20,96	-4,27	Itga5	-2,79	-2,76
Fst	-19,68	-4,09	Epas1	4,34	5,45
Mme	-18,76	-7,29	Eno2	5,07	4,26
Wisp1	-15,40	-2,77	Cxcr7	5,68	4,48
Sema3a	-11,53	-3,28	Ddc	7,09	9,49
Wnt5a	-10,53	-2,22	Prkcb	8,07	6,24
Pdgfc	-9,81	-3,09	Nbl1	11,80	8,34
Notch2	-7,91	-3,26	Th	12,03	7,24
Egfr	-7,48	-2,07	Egln3	12,94	12,26
Bmp5	-7,23	-2,43	P2ry12	16,41	10,45
Myc	-6,56	-2,03	Lcn2	21,96	15,29
Cdkn1a	-5,75	-2,62	Drd2	26,84	5,95
Wif1	-4,48	-2,43	Fgf11	28,68	6,47
Nes	-2,71	-1,57	Ret	31,87	12,18
Fgfr1	-1,32	-2,03	Cxcl14	50,92	25,32
Aqp1	-2,34	-2,42	Tac2	59,29	28,28
Hif1a	-7,03	-3,29	Notch4	74,05	2,39
Mmp9	-100,63	-7,29	Adora2a	94,55	10,12
Nrep	-10,30	-4,47	Ecel1	136,41	11,68
Thbs1	-38,17	-12,65	Xpnp2	505,56	59,32

#### 8.4 Huella genética de los progenitores y de las células neuronales del cuerpo carotídeo

Los datos aportados por los microarrays fueron utilizados para elaborar el *perfil de expresión* de los progenitores y de las células glómicas del CC. El perfil de expresión consiste en genes que definan las dos poblaciones celulares y las diferencien de otras en el CC y que, por consiguiente, sirvan como marcadores que ayuden a su estudio. Para ello filtramos los genes obtenidos mediante el análisis de microarrays usando un valor de  $FCH > 9$  y  $FDR < 0,01$ . En la población NSdiff obtuvimos 31 genes que cumplían dichos criterios, y en la población NSundiff sólo 3 genes (Tabla 9). El primer gen con mayores diferencias de expresión en NSundiff es *Thrombospondin 1*, el cual codifica para una glicoproteína de adhesión que media la interacción célula-célula y célula-matriz. Esta proteína juega un papel en angiogénesis y tumorigénesis (Ghajar et al., 2013; Qin et al., 2013; Lee et al., 2014). El segundo gen es *Tenascin-N*, que se expresa en células en migración derivadas de la cresta neural durante la embriogénesis y el organismo adulto. Esta proteína es similar a *Tenascin-C* y ambas son reguladas durante el desarrollo. Las tenascinas están relacionadas con la adhesión y migración, pudiendo estimularlas o inhibirlas según el tipo celular (Chiquet-Ehrismann et al., 1988; Lotz et al., 1989). La modulación de la adhesión es un mecanismo que influye en la proliferación celular, la migración y la diferenciación. *Tenascin-C* ha sido descrita en varios nichos de células madre. La tercera proteína que obtenemos es la *Membrane metallo endopeptidase* (Mme), también llamada CD10, que consiste en una endopeptidasa que inactiva varias hormonas peptídicas como glucagón,

encefalinas, sustancia P, neurotensina, oxitocina y bradiquinina, entre otras. Su expresión está asociada a varios tipos de cáncer. Los genes mayormente expresados en las NSdiff son de nuevo genes asociados al fenotipo neuronal y a un estado de diferenciación compatible con el sistema nervioso (Tabla 9).

**Tabla 9. Huella genética de los progenitores y las células neuronales del CC**

DIFERENTIATED NS			UNDIFFERENTIATED NS		
GENE	SYMBOL	FCH	GENE	SYMBOL	FCH
X-prolyl aminopeptidase 2	Xpnpep2	59,32	thrombospondin 1	Thbs1	12,65
tachykinin 2	Tac2	28,28	tenascin N	Tnn	10,29
chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Cxcl14	25,32	membrane metallo endopeptidase	Mme	9,07
dopamine beta-hydroxylase	Dbh	25,10			
tryptophan hydroxylase 1	Tph1	23,56			
family with sequence similarity 70, member B	Fam70b	21,53			
fetuin B	Fetub	16,79			
G protein-coupled receptor 155	Gpr155	16,76			
carbonic anhydrase 12	Car12	16,18			
lipocalin 2	Lcn2	15,29			
neuronatin	Nnat	15,20			
similar to RIKEN cDNA 2610318G18	Tmem150c	14,98			
glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing	Gdpd2	13,94			
neuronal pentraxin 2	Nptx2	13,52			
ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 3	St8sia3	13,42			
gap junction protein, beta 5	Gjb5	12,78			
EGL nine homolog 3 (C. elegans)	Egln3	12,26			
ret proto-oncogene	Ret	12,18			
secretogranin III	Scg3	11,69			
endothelin converting enzyme-like 1	Ecel1	11,68			
histocompatibility 2, class II antigen E alpha	RT1-Da	11,47			
regulated endocrine-specific protein 18	Resp18	11,05			
purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12	P2ry12	10,45			
adenosine A2a receptor	Adora2a	10,12			
Klotho	Kl	9,92			
trinucleotide repeat containing 4	Tnrc4	9,66			
dopa decarboxylase	Ddc	9,49			
VGF nerve growth factor inducible	Vgf	9,48			
natriuretic peptide precursor C	Nppc	9,43			
GTP cyclohydrolase 1	Gch1	9,38			
immunoglobulin superfamily, member 9	Igsf9	9,10			

## 8.5 Funciones biológicas representadas en los progenitores neurales y en las células neuronales del cuerpo carotídeo

Los resultados de los microarrays de las NSundiff y las NSdiff se utilizaron también para estudiar las funciones biológicas y las rutas de señalización representadas en las CMCC y en las células glómicas. Para este objetivo se empleó el programa Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (ver apartado 5.4 de los “*Materiales y métodos*”). Este software proporciona un modo fácil de analizar e interpretar el significado biológico de los datos genómicos. El programa ayuda a descubrir las conexiones causales ocultas en los datos, e identifica las relaciones, mecanismos, funciones y rutas de interés dentro de la lista de genes expresados diferencialmente.

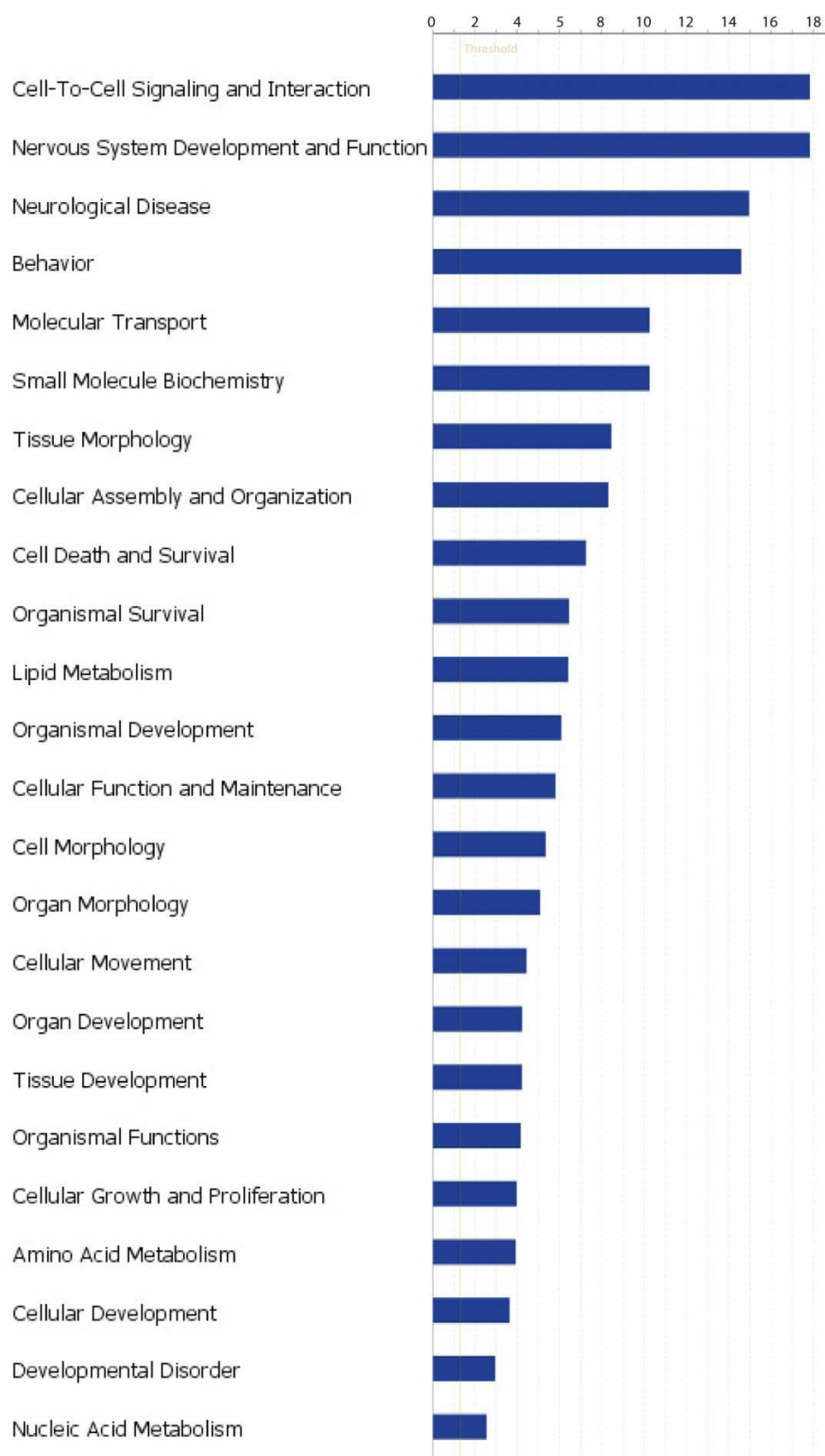
Aplicando los parámetros de  $FCH \geq 2$  y  $FDR < 0,01$  a los datos obtenidos en los análisis de microarrays se obtuvo un listado de genes altamente expresados en cada población de neuroesferas. Con cada listado se llevó a cabo un *IPA Core Analysis*, el cual proporciona información sobre las rutas de señalización, redes moleculares y procesos biológicos, que están significativamente representados en el conjunto de datos. El programa IPA muestra las funciones biológicas como *Biofunciones*, las cuales son agrupadas en diferentes Categorías. Las *Biofunciones* constituyen la información más relevante y específica, ya que las *Categorías* se emplean para agrupar *Biofunciones* similares y tener así una visión más general de los procesos que tienen lugar.

Las Figuras 37 y 38 muestran las *Categorías* más importantes en las NSundiff y en las NSdiff ordenadas según su p-value. Seguidamente, se muestran tablas con las *Biofunciones* más representadas (Tablas 10, 11 y 12). Las *Biofunciones* obtenidas para cada población demuestran de nuevo que las diferencias entre NSundiff y NSdiff son grandes, y que los procesos representados correlacionan con los fenotipos esperados para cada población. Cuando una *Categoría* se repite en ambas tipos de neuroesferas, como por ejemplo 'Cellular assembly and organization', las *Biofunciones* contenidas son muy distintas y distinguen perfectamente a ambas poblaciones. Las NSdiff (Tabla 11) presentan numerosos procesos relacionados con la sinapsis neuronal y el sistema nervioso. Por el contrario, las NSundiff (Tabla 10) revelan funciones implicadas en el movimiento celular, desarrollo embrionario y proliferación celular. Además de los procesos biológicos propios de progenitores, en las NSundiff aparecen otros procesos relacionados con el linaje mesectodérmico de la cresta neural. Estas funciones hacen referencia a tejidos derivados de dicha estructura germinal, tales como músculo liso, tejido vascular, conectivo, y óseo, reafirmando la multipotencia de las CMCC y el origen embrionario de estos progenitores. La presencia tan destacada de estas *Biofunciones* en las NSundiff podría indicar que está teniendo lugar cierta especificación hacia el linaje mesectodérmico en el núcleo de las neuroesferas enriquecidas en progenitores.

Los datos obtenidos en este análisis confirman que los progenitores del CC, son progenitores multipotentes capaces de generar células de fenotipo neural y células de fenotipo mesectodérmico, y que son requeridas señales específicas del microambiente para promover la diferenciación hacia los diferentes linajes derivados.



**Figura 37. Categorías destacadas en NSundiff.**



**Figura 38. Categorías destacadas en NSdiff.**



Tabla 10. Biofunciones destacadas en las células progenitoras del CC.

NSundiff- Categories	Biofunctions	p-value	# molecules	Predicted Activation State	z-score
Cellular Movement	cell movement	9,44E-30-1,86E-05	172		4,91
	migration of cells	9,44E-30	165	Increased	4,284
	invasion of cells	3,00E-28	152	Increased	3,271
	chemotaxis of cells	1,80E-20	78	Increased	4,8
	cell movement of endothelial cells	2,69E-13	52	Increased	1,725
	cell movement of connective tissue cells	3,11E-13	40		1,281
	cell movement of muscle cells	3,91E-12	30		1,514
	cell movement of smooth muscle cells	1,30E-11	26		1,562
	migration of blood cells	2,09E-10	23		2,859
	homing of blood cells	3,76E-10	66	Increased	2,593
	migration of fibroblast cell lines	1,06E-06	31	Increased	2,034
		5,39E-06	14	Increased	
		6,36E-26-2,87E-05	315		
	neoplasia of cells	1,29E-10	36	Increased	3,324
Cancer	growth of tumor	2,98E-10	40	Increased	2,109
	tumorigenesis of cells	6,79E-09	26	Increased	2,849
	cell transformation	1,79E-07	41	Increased	3,105
	invasion of tumor cells	2,97E-07	19	Increased	2,395
	astrocytoma	1,04E-05	15		
	glioblastoma cancer	2,36E-05	13		
		2,82E-25-2,19E-05	129		
	development of cardiovascular system	2,82E-25	106	Increased	3,295
	development of blood vessel	6,52E-24	89	Increased	3,095
	angiogenesis	3,47E-21	76	Increased	2,68
	vasculogenesis	5,32E-19	75	Increased	2,87
	neovascularization	3,18E-12	24	Increased	2,735
		6,52E-24-2,93E-05	186		
	morphogenesis of skeletal system	4,47E-09	16		
Organismal Development	epithelial-mesenchymal transition	2,97E-08	19		1,919
	size of body	8,40E-06	58	Increased	7,193
	development of bone marrow	1,04E-05	15		1,429

NSundiffs- Categories	Biofunctions	p-value	# molecules	Predicted Activation State	z-score
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	1,62E-18-2,77E-05	220	Increased	4,153
	proliferation of connective tissue cells	1,62E-18	208	Increased	2,695
	proliferation of fibroblasts	6,71E-18	66	Increased	2,495
	proliferation of muscle cells	3,04E-12	40	Increased	2,626
	proliferation of smooth muscle cells	9,33E-09	34	Increased	2,38
	proliferation of endothelial cells	2,62E-08	28	Increased	0,161
	proliferation of cancer cells	2,64E-08	29	Increased	2,21
	proliferation of mesenchymal cells	4,31E-08	32	Increased	2,96
	stimulation of cells	1,23E-07	12	Increased	3,447
	proliferation of stem cells	1,27E-06	26	Increased	1,486
Cellular Development	formation of blood cells	2,42E-06	17	Increased	2,357
		1,50E-05	13	Increased	
	differentiation of connective tissue cells	4,11E-17-3,04E-05	195		
	differentiation of cells	4,11E-17	61	Increased	1,644
	differentiation of bone marrow cells	1,57E-13	129	Increased	5,026
	differentiation of hematopoietic progenitor cel	4,52E-09	23	Increased	2,948
	branching of cells	1,40E-06	23	Increased	2,362
		9,57E-06	16	Increased	2,008
	delay in mitosis of tumor cell lines	4,74E-15-2,79E-05	110	Decreased	-2,201
	M phase	1,21E-07	7	Increased	2,377
Organismal Functions	mitogenesis	2,14E-06	22	Increased	2,999
		3,21E-06	19	Increased	
	healing of lesion	5,25E-15-1,89E-14	30		
	healing of wound	5,25E-15	30		
		1,89E-14	29		
Skeletal and Muscular System Development and Function	differentiation of osteoblasts	1,01E-14-2,79E-05	128		1,708
	development of muscle	3,83E-12	31	Increased	2,523
	length of long bones	5,42E-10	37	Increased	2,365
	size of bone	3,45E-09	13	Increased	2,175
	ossification of bone	3,51E-09	28	Increased	1,082
	morphology of growth plate	1,64E-09	22		
	limb development	1,29E-09	16		
	morphogenesis of embryonic skeleton	1,07E-07	21		1,98
	bone mineral density	3,17E-06	10		
		2,40E-05	17	Increased	2,018
Tissue Development		1,01E-14-2,93E-05	207		
	development of connective tissue	1,05E-14	39	Increased	2,375
	development of epithelial tissue	3,85E-14	51		1,481
	attachment of cells	7,02E-10	20	Increased	2,835
	aggregation of cells	3,81E-09	33	Increased	2,006
	adhesion of epithelial cells	3,30E-06	14	Increased	2,021

Continuación de Tabla 10. Biofunciones destacadas en las células progenitoras del CC.

NSundiff- Categories	Biofunctions	p-value	# molecules	Predicted Activation State	z-score
Tissue Morphology	morphology of connective tissue	1,89E-14-2,94E-05	174		
	quantity of cells	6,30E-13	52		
	morphology of blood vessel	2,63E-12	116	Increased	4,054
	quantity of blood cells	3,04E-10	33		
	quantity of stem cells	1,40E-06	67	Increased	2,307
Embryonic Development		6,28E-06	9		1,628
		3,5E-14-2,93E-05	160		
	morphogenesis of embryonic tissue	1,04E-08	20	Increased	2,813
	migration of neural crest cells	6,14E-08	12		0,863
	proliferation of embryonic cells	1,69E-06	24	Increased	3,355
Cell Death and Survival	tooth development	1,71E-06	14		
	closure of embryonic tissue	9,35E-06	15	Increased	2,213
		2,87E-12-2,23E-05	188		
	apoptosis	2,87E-12	157		-1,793
	cell survival	7,31E-08	83	Increased	5,289
Cellular Assembly and Organization	cell viability	1,78E-06	74	Increased	5,013
		5,07E-12-2,95E-05	152		
	organization of fibrils	5,07E-12	14		
	organization of collagen fibrils	6,18E-12	13		
	organization of cytoskeleton	2,76E-11	89	Increased	3,732
	organization of cytoplasm	2,04E-10	92	Increased	3,732
	fibrogenesis	4,04E-10	40	Increased	2,464
	formation of filaments	6,92E-09	37	Increased	2,535
	growth of plasma membrane projections	1,45E-07	39	Increased	2,198
	formation of cytoskeleton	1,51E-07	32	Increased	2,271
	formation of actin filaments	4,65E-07	27	Increased	2,136
	formation of cellular protrusions	6,62E-07	53	Increased	3,982
	microtubule dynamics	6,77E-07	68	Increased	3,992
	formation of actin stress fibers	9,46E-06	21	Increased	1,991
DNA Replication, Recombination, and Repair		1,5E-09-6,29E-07	54		
	synthesis of DNA	1,50E-09	42	Increased	2,344
	segregation of chromosomes	6,29E-07	14		1,664
Nervous System Development and Function		9,08E-07-1,64E-05	38		
	growth of neurites	9,08E-07	37	Increased	2,58
	fasciculation of nervous tissue	1,64E-05	7		1,671

Continuación de Tabla 10. Biofunciones destacadas en las células progenitoras del CC.

Tabla 11. Biofunciones destacadas en las células neuronales del CC.

NSdiff- Categories	Biofunctions	p-value	# molecules	Predicted Activation State	z-score
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	neurotransmission	1,48E-18-1,26E-02	139		1,988
	synaptic transmission	1,48E-18	69		2,274
	secretion of neurotransmitter	2,15E-16	58	Increased	0,346
	quantity of catecholamine	5,92E-11	28	Increased	2,2
	concentration of dopamine	3,72E-10	27	Increased	2,064
	synaptic transmission of brain cells	2,25E-09	21	Increased	2,158
	plasticity of synapse	1,58E-08	13	Increased	2,619
	activation of neuroglia	6,02E-05	16	Increased	2,761
		1,02E-02	11	Increased	
		1,48E-18-1,33E-02			
Nervous System Development and Function	coordination	3,06E-11	36	Increased	5,309
	morphology of nervous system	1,11E-09	86	Decreased	-2,595
	transport of synaptic vesicles	3,69E-05	11	Increased	
	function of neurons	1,57E-04	14		
Neurological Disease		1,11E-15-1,28E-02			
	Movement Disorders	1,11E-15	121	Decreased	-4,978
	ataxia	9,79E-08	28	Decreased	-4,516
	Neurodegeneration	5,32E-05	23	Decreased	-2,003
Behavior	tremor	5,32E-03	15	Decreased	-2,747
		2,6E-15-8,37E-03			
	behavior	2,60E-15	110	Increased	3,905
	cognition	2,48E-08	48	Increased	3,548
	learning	2,43E-07	44	Increased	3,249
	locomotion	6,36E-07	35		1,236
	memory	5,12E-05	25	Increased	2,308
Molecular Transport		5,62E-11-1,31E-02			
	quantity of monoamines	5,62E-11	33	Increased	2,569
	transport of molecule	1,45E-06	105	Increased	4,26
	transport of metal ion	9,16E-05	32	Increased	2,236
	transport of cation	5,52E-04	36	Increased	2,449
	transport of Ca2+	1,36E-03	13		
	transport of ion	2,69E-03	41	Increased	2,121
	quantity of cyclic nucleotides	1,01E-02	17	Increased	2,622

NSdiff- Categories	Biofunctions	p-value	# molecules	Predicted Activation State	z-score
Small Molecule Biochemistry	synthesis of lipid	5,62E-11-1,34E-02	53	Increased	3,101
	metabolism of membrane lipid derivative		30	Increased	2,789
Tissue Morphology		3,58E-09-1,33E-02			
	morphology of nervous tissue	3,58E-09	65		
	morphology of neurites	1,37E-05	22		
	morphology of synapse	3,04E-05	11		
	morphology of dendrites	1,25E-04	12		
	morphology of neurons	1,27E-03	26		
	morphology of striatum	1,28E-02	5		
	morphology of axons	1,33E-02	9		
		4,95E-09-1,11E-02			
Cellular Assembly and Organization	quantity of synaptic vesicles	4,95E-09	13		1,172
	quantity of vesicles	3,15E-08	18		1,049
	fusion of synaptic vesicles	1,05E-06	6		1,154
	exocytosis of vesicles	1,57E-06	12		0
	transport of vesicles	1,40E-05	17		1,225
	depolarization of cellular membrane	4,21E-05	12		1,353
	docking of vesicles	1,52E-04	7		
	neuritogenesis	2,32E-04	42		1,226
	formation of cellular protrusions	2,73E-04	61	Increased	3,475
	formation of plasma membrane projections	4,83E-04	45	Increased	2,052
	exocytosis of dense-core vesicles	9,73E-04	4		
	microtubule dynamics	1,02E-03	78	Increased	2,947
	size of synapse	1,11E-03	3		
	organization of cytoskeleton	1,51E-03	88		
	formation of dendrites	1,95E-03	13	Increased	2,532
	exocytosis of synaptic vesicles	4,63E-03	5		

Continuación de Tabla 11. Biofunciones destacadas en las células neuronales del CC.

NSdiff- Categories	Biofunctions	p-value	# molecules	Predicted Activation State	z-score
Cell Death and Survival	neuronal cell death	5,72E-08-1,11E-02	67		-1,009
	apoptosis of neurons	5,72E-08	41		-1,297
	cell death of brain cells	8,68E-06	28		0,989
	cell death of dopaminergic neurons	1,21E-04	7		-0,428
	cell death	1,95E-03	202		-1,254
Organismal Survival	organismal death	3,6E-07-3,71E-05	183	Decreased	-11,52
Organismal Development	size of body	8,27E-07-1,11E-02	82	Increased	8,115
Cellular Movement	transport of synaptic vesicles	3,69E-05-4,63E-03	11		
	innervation of Purkinje cells	3,69E-05	4		
	migration of microglia	6,07E-04	4		1,067
Cellular Growth and Proliferation	stimulation of neurons	1,08E-04-9,5E-03	12		0,456
	excitation of neurons	1,08E-04	9		-0,692
Nucleic Acid Metabolism	biosynthesis of cyclic nucleotides	2,84E-03-1,34E-02	22	Increased	2,34
	metabolism of cyclic nucleotides	2,84E-03	23	Increased	2,34
	quantity of cyclic nucleotides	3,71E-03	17	Increased	2,622
	synthesis of cyclic GMP	1,01E-02	7		1,771

Continuación de Tabla 11. Biofunciones destacadas en las células neuronales del CC.



**Tabla 12. Las cinco Biofunciones más destacadas en NSundiff y NSdiff.**

	UNDIFF-NS Biofunctions	DIFF-NS Biofunctions
top5 z-score	cellular movement of tumor cell lines homing size of body differentiation of cells cell survival	coordination transport of molecules behaviour cognition size of body
top5 p-value	metastasis cell movement migration of cells development of blood vessels development of cardiovascular system	synaptic transmission neurotransmission coordination behaviour movement disorder

El *Core analysis* utilizado para analizar los genes de las NSundiff y de las NSdiff proporcionó, además de las *biofunciones*, una serie de rutas canónicas asociadas a las moléculas representadas en cada población de neuroesferas. Estas rutas aparecen ordenadas en las tablas 13 y 14 según el valor de *p-value*. Las tablas muestran también el *Ratio*. Este parámetro es la relación entre las moléculas de nuestros datos que aparecen en dicha ruta y las moléculas totales de la ruta en cuestión. En la tabla 13 se puede observar que muchas de las rutas que aparecen en NSundiff están asociadas con proliferación celular y células madre. Otras de estas rutas son específicas de tejido óseo, relacionadas con hematopoyesis o implicadas en cáncer de células gliales. Las vías de señalización presentes en NSdiff están por el contrario relacionadas con la biología neuronal.

## 8.6 Identificación de marcadores de membrana en progenitores neurales y en células neuronales

Actualmente, el conocimiento acerca del fenotipo molecular de los progenitores del CC es limitado y no se han descrito marcadores que permitan un aislamiento prospectivo de estas células para profundizar en su estudio. A este respecto, los análisis de microarrays constituyen una herramienta valiosa en la búsqueda de marcadores de membrana. Para este fin se realizó un escrutinio, dentro de cada población, de genes que siendo proteínas de membrana expresaran un alto FCH. Esto proporcionó una lista de genes potencialmente utilizables para la separación de células por citometría de flujo (Tablas 15 y 16). En NSundiff, el gen con mayor FCH es *Mme*, también llamado *CD10*. Este gen aparece también en la sección 8.4 como parte del grupo del perfil genético de los progenitores del CC. El uso de este marcador permitió la separación de una población celular capaz de formar neuroesferas en cultivo con mayor eficiencia que el cultivo de células totales de CC. Los estudios sobre el marcador CD10 se están completando independientemente del presente trabajo de investigación.

**Tabla 13. Rutas de señalización canónicas destacadas en NSundiff.**

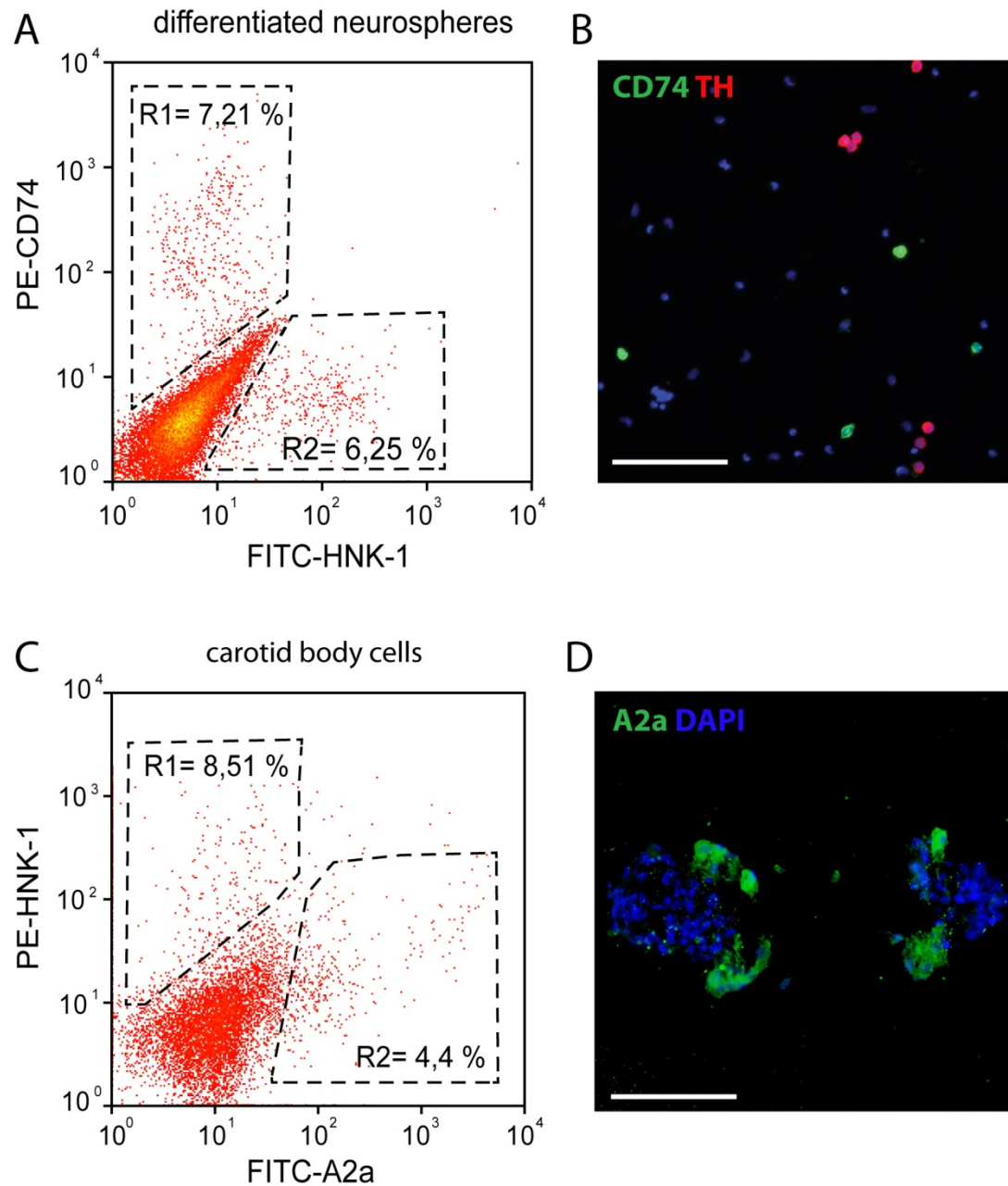
<b>Ingenuity Canonical Pathways NSundiff</b>	<b>-log(p-value)</b>	<b>Ratio</b>
Inhibition of Matrix Metalloproteases	8,15	0,282
Rheumatoid Arthritis	7,03	0,105
Axonal Guidance Signaling	4,92	0,0649
PPAR Signaling	4,43	0,115
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	3,76	0,129
Glioblastoma Multiforme Signaling	3,72	0,0886
Glioma Signaling	3,14	0,0935
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	3,06	0,0795
PTEN Signaling	2,9	0,0846
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	2,9	0,125
Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	2,83	0,0794
Pathway	2,81	0,0741
Cyclins and Cell Cycle Regulation	2,7	0,0899
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	2,68	0,0862
IL-8 Signaling	2,43	0,0674
HIF1 $\alpha$ Signaling	2,36	0,0865
Hematopoiesis from Multipotent Stem Cells	2,31	0,25
Chondroitin Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	2,24	0,111
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	2,09	0,0909
Sonic Hedgehog Signaling	2,06	0,129
p38 MAPK Signaling	2,03	0,0769
Chondroitin and Dermatan Biosynthesis	1,99	0,333
PDGF Signaling	1,91	0,0886
Chondroitin Sulfate Biosynthesis	1,91	0,0943
Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling	1,84	0,0636

**Tabla 14. Rutas de señalización canónicas destacadas en NSdiff.**

<b>Ingenuity Canonical Pathways Nsdiff</b>	<b>-log (p-value)</b>	<b>Ratio</b>
Catecholamine Biosynthesis	3,92	0,75
Serotonin Receptor Signaling	3,48	0,212
OX40 Signaling Pathway	3,05	0,101
Dopamine Receptor Signaling	2,76	0,132
Sphingosine and Sphingosine-1-phosphate Metabolism	2,44	0,375
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	2,44	0,143
CREB Signaling in Neurons	2,33	0,0833
Reelin Signaling in Neurons	1,95	0,11
Cdc42 Signaling	1,89	0,0702
Glutamate Receptor Signaling	1,87	0,113
Tec Kinase Signaling	1,68	0,0739
Serotonin and Melatonin Biosynthesis	1,66	0,4
eNOS Signaling	1,58	0,0815
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	1,47	0,0729
Melatonin Signaling	1,46	0,0986
Huntington's Disease Signaling	1,42	0,0684
Calcium Signaling	1,42	0,0647
CXCR4 Signaling	1,4	0,075
P2Y Purigenic Receptor Signaling Pathway	1,39	0,0794
BMP signaling pathway	1,3	0,0909

Por otro lado, los datos genéticos proporcionados por los microarrays también facilitaron la identificación de posibles marcadores para la separación de células glómicas por citometría de flujo. Los genes que codifican para proteínas de membrana en las neuroesferas enriquecidas en células dopaminérgicas aparecen en la tabla 16. Muchas de estas moléculas eran esperadas, como el receptor de dopamina *D2* o *P2ry12*, y otras, como *Ecel1* (endothelin converting enzyme-like1), o *CD74* (major histocompatibility complex, class II), eran más desconocidas. Sólo se encontraron anticuerpos comerciales para separación por citometría para los receptores CD74 y A2a. El gen CD74 codifica una chaperona que regula la presentación de antígenos para la respuesta inmune, pero también sirve como receptor de la citoquina MIF (factor inhibitorio de migración del macrófago). Cuando MIF se une al receptor CD74 inicia vías de supervivencia y proliferación celular (Cherry et al., 2003). CD74 es además usado como marcador de células madre mesenquimales (MSC) (Ishii et al., 2005) y está expresado por neuronas del oído interno, en la etapa embrionaria y adulta, donde regula el crecimiento direccional de neuritas y la supervivencia de neuronas del ganglio estatoacústico (Bank et al., 2012). Para conocer si CD74 estaba siendo expresado por las células glómicas se llevó a cabo un análisis por citometría de células procedentes de la dispersión de neuroesferas diferenciadas (NSdiff) e indiferenciadas (NSundiff) marcadas con CD74 y HNK-1. HNK-1 fue utilizado como marcador de una subpoblación de células glómicas (Pardal et al., 2007). Los porcentajes obtenidos fueron 7,21% de CD74+ y 6,25% de HNK-1+ en la población de NSdiff, y 1,6% de CD74+ y 2,45% de HNK-1+ en NSundiff, pero no se obtuvo colocalización de ambos marcadores. Como HNK-1 sólo marca un grupo de células glómicas, se realizó posteriormente una inmunocitoquímica de células dispersas de CC completo con los marcadores CD74 y TH, para comprobar si las células TH+ expresaban el receptor. CD74 presentó una tinción brillante y bien definida pero que no colocalizaba en ningún caso con la tinción de TH. Por lo tanto, aunque el gen *CD74* está sobreexpresado en las condiciones utilizadas para la obtención de NSdiff, no parece estar directamente expresado por las células glómicas o tipo I, y por tanto no puede ser utilizado para el aislamiento de este tipo celular.

Otro de los receptores que se probaron mediante citometría de flujo para separar células glómicas fue A2a, con el que se identificó una población positiva que comprendía cerca del 6% del CC completo. Estas células fueron separadas y sembradas en cubres para su caracterización mediante inmunocitoquímica. La mayoría de las células separadas mediante A2a no presentaron tinción para TH. Sin embargo, se realizó tinción con este marcador en neuroesferas de CC y se vio que la expresión de A2a quedaba confinada a los *blebs*. Estos resultados, aunque muy preliminares, podían significar que el receptor A2a es expresado por células TH provenientes de la diferenciación en cultivo de progenitores del CC, mientras que falla en el marcaje de las células glómicas presentes en el CC *in vivo*, sugiriendo que ambos tipos de células TH+ no son totalmente equivalentes.



**Figura 39. Expresión de marcadores de membrana en células glómicas.** **A** y **C** Histogramas de citometría de flujo que muestran que el marcador CD74 (R1 en A) y el receptor A2a (R2 en C) no están expresados en las células HNK-1+ en las NSdiff (A) o en células dispersas de CC (C). **B** Inmunocitoquímica de células dispersas de CC donde se observa que la tinción CD74 no colocaliza con el marcador TH. **D** Imagen de dos secciones de neuroesferas teñidas con A2a que muestran expresión del receptor confinada a la región de los *blebs*. Barra de escala en B y D, 100  $\mu$ m.

Tabla 15. Proteínas de membranas más expresadas en NSundiff.

UNDIF-NS	
Mme membrane metallo endopeptidase	Gypc glycophorin C (Gerbich blood group)
Has2 hyaluronan synthase 2	Lpar1 lysophosphatidic acid receptor 1
Ramp3 receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 3	Mmp14 matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
Steap1 six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	Mmp14 matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
Ptgir prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	Slc16a4 solute carrier family 16, member 4 (monocarboxylic acid transporter 5)
Ednrb endothelin receptor type B	Fgfr1 Fibroblast growth factor receptor 1
Cav1 caveolin 1, caveolae protein	Homer1 homer homolog 1 (Drosophila)
Olr1 oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	Kcnn4 potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel
Tpbp trophoblast glycoprotein	Sdc2 syndecan 2
Htr2a 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	Acvr11 activin A receptor type II-like 1
Notch2 Notch homolog 2 (Drosophila)	Ednra endothelin receptor type A
Adcy7 adenylate cyclase 7	Igf2r insulin-like growth factor 2 receptor
Il1r1 interleukin 1 receptor, type I	Slc16a6 solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)
Slc1a3 solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3	Ggt1 gamma-glutamyltransferase 1
F2r coagulation factor II (thrombin) receptor	Tgfa transforming growth factor alpha
Csf1 colony stimulating factor 1 (macrophage)	Phex phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked
Pdgfra platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Slc7a6 solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 6
Flrt2 fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	Gpr137b G protein-coupled receptor 137B
Dcbl2 discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	Ptgfr prostaglandin F receptor
Tspan4 tetraspanin 4	Kcna4 potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 4
Osmr oncostatin M receptor	Ptprg protein tyrosine phosphatase, receptor type, G
Fzd2 frizzled homolog 2 (Drosophila)	Glec2d C-type lectin domain family 2, member d
Aqp1 aquaporin 1	Icam1 intercellular adhesion molecule 1
Slc43a1 solute carrier family 43, member 1	Slc12a2 solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2
Ankh ankylosis, progressive homolog (mouse)	Adcy3 adenylate cyclase 3
Gja1 gap junction protein, alpha 1	Cd48 Cd48 molecule
Sdc4 syndecan 4	Adam23 ADAM metalloproteinase domain 23
Efnb2 ephrin B2	Ppap2a phosphatidic acid phosphatase type 2A
Fat1 FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)	Calcr1 calcitonin receptor-like
Zyx zyxin	Cd46 CD46 molecule, complement regulatory protein
Epha2 Eph receptor A2	Acvr1 activin A receptor, type I
Slc6a4 solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	Drd1a dopamine receptor D1A
Tgfb2 transforming growth factor, beta receptor II	Sstr4 somatostatin receptor 4



Tabla 16. Proteínas de membrana más expresadas en NSdiff.

DIF-NS	
Ecel1 endothelin converting enzyme-like 1	Slc5a6 solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6
P2ry12 purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12	Pam peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
Adora2a adenosine A2a receptor	Kcnj11 potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11
Amigo2 adhesion molecule with Ig like domain 2	Ptprf protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
Ntrk2 neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	Notch4 Notch homolog 4 (Drosophila)
Syt13 synaptotagmin XIII	Slc7a2 solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2
Cyb5b1 cytochrome b-561	Vamp1 vesicle-associated membrane protein 1
Cd74 Cd74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Trpc1 transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1
Drd2 dopamine receptor D2	Insr insulin receptor
Trpc5 transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5	Ncstn nicastrin
Gpr22 G protein-coupled receptor 22	Htr6 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6
Tspan13 tetraspanin 13	B2m beta-2 microglobulin
Ptpn protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	Lanc11 LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial)
Kcnh2 potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	Slc10a6 solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 6
Slc11a2 solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2	Syng1 synaptogyrin 1
Kcnk3 potassium channel, subfamily K, member 3	Efnb1 ephrin B1
Tgfb3 transforming growth factor, beta receptor III	Amigo1 adhesion molecule with Ig like domain 1
Nrxn1 neuroligin 1	Hcn4 hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4
Agtr2 angiotensin II receptor, type 2	Adcyap1r1 adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1
Tspan8 tetraspanin 8	Scarb2 scavenger receptor class B, member 2
Gabrb3 gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3	Tm2d1 TM2 domain containing 1
Slc18a2 solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2	Lamp1 lysosomal-associated membrane protein 1
Tm4sf4 transmembrane 4 L six family member 4	Cd53 Cd53 molecule
Gpr19 G protein-coupled receptor 19	Dclk1 doublecortin-like kinase 1
Bcam basal cell adhesion molecule	Slc25a14 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, brain), member 14
Npr1 natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A	Gpc4 glypican 4
Igfb1 immunoglobulin superfamily, member 1	Abcg1 ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
Prhr prolactin releasing hormone receptor	Slc4a3 solute carrier family 4 (anion exchanger), member 3
Enpp2 ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	Opcml opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
Plexn1 plexin B1	Fcgr2b Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)
Trpm2 transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2	Cnga3 cyclic nucleotide gated channel alpha 3
Tapbp TAP binding protein	Thy1 Thy-1 cell surface antigen
Acn2 amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal	Syt11 synaptotagmin XI
Glib glycine receptor, beta	Abcd2 ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
Tm7sf2 transmembrane 7 superfamily member 2	Sema4f sema domain
Podxl2 podocalyxin-like 2	Slc17a5 solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5
Cspg5 chondroitin sulfate proteoglycan 5	Psen2 presenilin 2
Il4ra interleukin 4 receptor, alpha	Slc29a1 solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1
Gabrg2 gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 2	Mcoln1 mucolipin 1
Igf1r insulin-like growth factor 1 receptor	Oprm1 opioid receptor, mu 1
Prom1 prominin 1	Bcap31 B-cell receptor-associated protein 31



# DISCUSIÓN

---

## 1 El nicho del cuerpo carotídeo como modelo de neurogénesis

El descubrimiento de la existencia de células proliferativas que se convierten en neuronas en el cerebro adulto acabó, en la segunda mitad del siglo XX, con el dogma que consideraba que el cerebro de mamíferos no sufría procesos de regeneración tras completar su desarrollo embrionario (Altman and Das, 1965). Actualmente, está ampliamente aceptado que en el sistema nervioso se generan e integran continuamente nuevas neuronas durante la vida adulta (Reynolds et al., 1989; Doetsch et al., 1999a; Gage, 2000; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Zhao et al., 2008). La neurogénesis es un proceso complejo de gran interés en el campo de la neurociencia debido a las implicaciones que supone para el tratamiento de patologías del sistema nervioso. Sin embargo, la función y las claves de la neurogénesis adulta no se conocen en profundidad (Suda et al.; Chell and Frisen). Los eventos neurogénicos parecen participar en la homeostasis del tejido, compensando la pérdida fisiológica de neuronas, (Biebl et al., 2000) o en la reparación y regeneración del sistema nervioso tras ciertas lesiones (Font et al., 1991; Font et al., 2001). Estudios más recientes sostienen que la neurogénesis está modulada por los requerimientos fisiológicos y las condiciones ambientales del organismo, por lo que su función consistiría en permitir la adaptación del tejido a las necesidades dinámicas del cerebro (Chell and Frisen; Song et al., 2012). Se ha propuesto que la formación de nuevas neuronas en el hipocampo, que junto con la SVZ de los ventrículos laterales forma los dos focos principales de neurogénesis en el SNC, podría estar implicada en el aprendizaje y en la formación de la memoria (Shors et al., 2001; Kempermann, 2002). Además de en el cerebro, se han descrito poblaciones de NSC en el sistema nervioso periférico, al que pertenece el nicho neurogénico del CC. Trabajos realizados anteriormente por nuestro grupo y estudios recogidos en esta tesis doctoral, han descrito procesos de formación de nuevas neuronas en el CC como respuesta a una situación fisiológica específica, la adaptación de este órgano a la hipoxemia crónica. Nuestros resultados han establecido la existencia de una población de progenitores neurales residentes en el CC que, durante hipoxia crónica, proliferan y se diferencian a neuronas dopaminérgicas que activan el centro respiratorio del tronco del encéfalo para aumentar la ventilación (Lopez-Barneo et al., 2001; Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014).

La investigación que hemos llevado a cabo en el CC muestra que las NSC de este órgano (CMCC) comparten muchas características con las NSC del sistema nervioso central. Entre ellas, podemos citar el fenotipo glial de los progenitores, la progresión a través del linaje celular y la irrigación vascular del nicho (Doetsch, 2003a; Pardal et al., 2007; Currle and Gilbertson, 2008; Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008; Pardal et al., 2010). En el CC, al igual que en los nichos neurogénicos centrales, la célula madre se activa y prolifera para generar un progenitor intermedio que expresa la proteína Nestina y que amplifica la población celular, diferenciándose finalmente hacia células neuronales maduras (Pardal et al., 2007). El análisis del marcador endotelial CD31 presentado en esta tesis muestra cómo la profusa red de vasos sanguíneos y capilares que irrigan el CC se entrelazan entre las células que forman los glomérulos. Esta vasculatura sufre angiogénesis durante la exposición a hipoxia crónica, describiendo una dinámica de crecimiento acorde

al aumento de parénquima neural experimentado por el órgano. La red de vasos sanguíneos parece estar fuertemente coordinada con las células neurales, pues al decrecimiento del tejido neural ocurrido en renormoxia le acompaña una reducción paralela del número de vasos. Estos resultados sugieren una comunicación estrecha entre las células endoteliales y las células progenitoras neurales que conforman el órgano.

Los mecanismos que controlan la transición de la quiescencia a la proliferación de las NSC son indispensables para la homeostasis y el correcto funcionamiento del sistema nervioso, ya que permiten responder a las necesidades fisiológicas del tejido (Miller and Gauthier-Fisher, 2009). El nicho neurogénico del CC presenta una ventaja destacable respecto a los nichos del SNC, y es que se conoce el estímulo ambiental, la hipoxia, que funciona como disparador del crecimiento del órgano. La tensión de oxígeno es una variable fácilmente controlable, por lo que el CC es un modelo ideal para estudiar los mecanismos de activación de la proliferación de las células madre y cómo la demanda fisiológica está acoplada a la neurogénesis.

## **2 Regulación de la actividad de las células madre del cuerpo carotídeo por las células neuronales maduras. *La sinapsis quimio-proliferativa***

El control fisiológico de los procesos de proliferación y diferenciación de las NSC es uno de los temas de vanguardia en la investigación neurobiológica actual. Las NSC están influenciadas por multitud de señales y parámetros que pueden provenir tanto del nicho en el que residen como de moléculas generadas en otros órganos más alejados del cuerpo y que llegan por circulación sanguínea (Doetsch, 2003a; Miller and Gauthier-Fisher, 2009; Voog and Jones, 2010; Wagers, 2012). El nicho de células madre se encarga de la concentración y coordinación de estas señales intrínsecas y extrínsecas que hacen que las NSC puedan adaptarse a las diferentes situaciones fisiológicas. La actividad neuronal constituye un parámetro importante que modula el comportamiento de los progenitores y es detectada por las células madre y los precursores por medio de la captación de neurotransmisores liberados por las neuronas (Chell and Frisen; Song et al., 2012; Berg et al., 2013). La percepción de la actividad neuronal conecta la neurogénesis con la experiencia, el aprendizaje y las situaciones ambientales que condicionan al individuo. Sin embargo, este acoplamiento entre la neurogénesis y la demanda fisiológica es un concepto relativamente nuevo y los mecanismos específicos y los componentes implicados son poco conocidos. En el SNC se han descrito los efectos de varios neurotransmisores sobre el comportamiento de las células madre (Berg et al., 2013). Animales con denervación de la vía nigroestriatal presentan una menor proliferación de las NSC en la SVZ debido a una disminución en el aporte de dopamina (Hoglinger et al., 2004). El circuito neuronal local de los nichos también está involucrado en procesos similares. La progenie más diferenciada del linaje celular ejerce mecanismos de control sobre sus progenitores para mantener el equilibrio entre las distintas poblaciones celulares del tejido. Tal es el caso de los neuroblastos que migran al bulbo olfatorio desde la SVZ, que inducen el arresto del ciclo celular de los progenitores GFAP+ mediante la liberación de GABA (Liu et al., 2005; Ge et al., 2006; Andang et al., 2008). En el giro dentado se ha encontrado que las neuronas granulares maduras modifican la quiescencia de sus progenitores mediante la acción de interneuronas GABAérgicas parvalbúmina-positivas. Estas

interneuronas liberan GABA cuando son activadas por las neuronas granulares, y este neurotransmisor mantiene la quiescencia de los progenitores de la capa subgranular (Song et al., 2012).

En el nicho neurogénico del CC las células madre se encuentran quiescentes en normoxia y salen de esa quiescencia cuando la tensión de oxígeno baja. Una cuestión fundamental es cómo estas células progresan del reposo a la proliferación. La investigación llevada a cabo en esta tesis doctoral sugiere que la neurogénesis en el CC está controlada por mecanismos dependientes de actividad neuronal y son las células glómicas neuronales las que inducen la activación de las CMCC. Inicialmente se presumía que la hipoxia podía modular directamente el estado de proliferación de las células madre del CC para inducir el crecimiento del órgano. La tensión de O<sub>2</sub> ha sido reconocida como una variable importante que regula la auto-renovación, la proliferación y la diferenciación de las células madre en varios de tejidos (Panchision, 2009; Mohyeldin et al., 2010). La mayoría de los nichos de células madre adultas tienen una tensión relativamente baja de O<sub>2</sub> que ayuda a mantener las células en un estado latente, con el metabolismo predominantemente anaeróbico, para preservarlas del exceso de producción de especies reactivas de oxígeno y otros factores de estrés (Suda et al.). Además, la estabilización de HIF induce proliferación en varios tipos de células (Kaelin and Ratcliffe, 2008), incluyendo las NSC del hipocampo (Panchision, 2009; Suda et al.). Sorprendentemente, la hipoxia no produce el efecto esperado sobre el comportamiento de los progenitores del CC. La exposición a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> de las CMCC, completamente aisladas de su nicho y cultivadas *in vitro* para promover la generación de neuroesferas, no alteró la proliferación de dichos progenitores. Estos resultados se confirmaron *in vivo* mediante la inhibición con DMOG de las PHD sensibles al O<sub>2</sub>, lo cual no estimuló el crecimiento del CC pese a la estabilización generalizada de HIF. Resultados similares se han obtenido de forma independiente por otro laboratorio con un inhibidor diferente de PHD (Bishop et al., 2013). Además, se estudió el crecimiento del CC en ratones transgénicos en los que se había abolido el gen *Hif1α* en las células sustentaculares (CMCC). Los ratones transgénicos presentaron la misma hipertrofia del CC en respuesta a la hipoxia crónica que los ratones silvestres. Nuestros datos indican que la estabilización de HIF no constituye la señal primaria que desencadena la transición de las CMCC desde la quiescencia (en normoxia) a la proliferación (en hipoxia). Ello sugiere que la activación fisiológica de los progenitores neurales del CC durante la exposición a hipoxia es una propiedad del nicho, en lugar de una característica intrínseca de las células madre.

La hipoxia no afecta directamente a las CMCC, pero sí despolariza a las células glómicas maduras, provocando la liberación de neurotransmisores que se vierten a los espacios sinápticos para que activen a las fibras nerviosas aferentes (Lopez-Barneo et al., 2001). En este trabajo proponemos que los factores incluidos en las vesículas de gránulo denso del CC, liberados durante la exposición a hipoxia, pueden actuar sobre las células progenitoras (sustentaculares o tipo II) que rodean a las células tipo I para inducir su proliferación y posterior diferenciación. Esta hipótesis se apoya en el concepto de *sinapsis quimio-proliferativa*, introducido en este trabajo (figura 40). Hemos mostrado mediante estudios morfológicos de microscopía electrónica, cómo las células sustentaculares (tipo II) emiten unas largas prolongaciones que envuelven a las células glómicas (tipo I), generando amplias zonas de contacto entre ambas células. La distancia de separación entre las membranas de las células tipo I y tipo II es menor de 50 nm, una distancia muy similar a aquella encontrada en las conexiones sinápticas. Además, la mayoría de

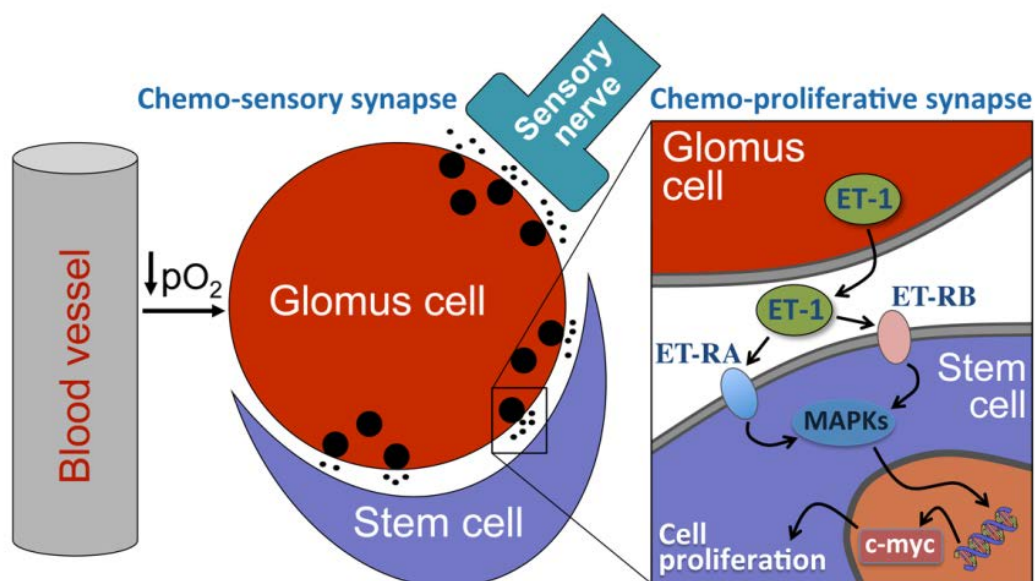
las vesículas de secreción de las células tipo I se encuentran localizadas enfrentadas a las células tipo II (Platero-Luengo et al., 2014). La idea de que las células neuronales tipo I podían regular la actividad de las CMCC fue corroborada por experimentos funcionales *in vivo* donde se procedió a la anulación de la comunicación por vesículas entre estas células. Se realizó un bloqueo de la liberación de neurotransmisores mediante el uso de cadmio, un bloqueante de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes que ha sido utilizado con éxito para el bloqueo de la exocitosis de las células tipo I en publicaciones anteriores de nuestro grupo (Urena et al., 1994). El bloqueo de vesículas por cadmio produjo una reducción significativa en la proliferación de las células del CC. Con este mismo fin, se utilizó la línea de ratón TH-SDHD, la cual exhibe una drástica reducción del número de vesículas secretoras en las células glómicas del CC (Díaz-Castro et al., 2012). El análisis de la proliferación en el CC de los ratones TH-SDHD demostró que la ausencia de vesículas en las células tipo I resulta en el menoscabo de la proliferación de los progenitores Nestina+ en respuesta a la hipoxia. Todos estos datos sugieren que las superficies de contacto entre progenitores y neuronas en el CC funcionan como estructuras sinápticas que denominamos *sinapsis quimio-proliferativa*, concepto relacionado con la sinapsis quimio-sensorial establecida entre las células tipo I y los terminales nerviosos aferentes (Platero-Luengo et al., 2014).

La existencia de los contactos sinápticos entre las células glómicas maduras y las CMCC es una especialización estructural diseñada para optimizar el principio general de control de la función de las células madre dependiente de actividad neuronal. Como se ha discutido anteriormente, tanto fibras nerviosas que proyectan desde otras zonas, como el circuito neuronal local pueden controlar la función de NSC en los nichos neurogénicos del SNC. Uno de los mecanismos por los que las NSC detectan los neurotransmisores liberados por las neuronas es el denominado “spill over” (Chell and Frisen; Song et al., 2012). Este mecanismo consiste en que las NSC captan los transmisores liberados por las neuronas de su alrededor ya que ambas células se encuentran suficientemente juntas. Así el transmisor es capaz de afectar a varios elementos distintos, y así la neurona que lo ha producido no ejerce su influencia sólo sobre la célula estrictamente postsináptica. Otra forma de secreción se encuentra en los neuroblastos de la SVZ. Los neuroblastos secretan GABA de manera no sináptica y no asociada a vesículas, y este GABA actúa sobre receptores localizados en los progenitores de la zona (Berg et al., 2013). Sin embargo, el establecimiento de un contacto sináptico directo como el que ocurre en el CC, entre las células diferenciadas maduras y sus progenitores, no ha sido descrito hasta ahora, y constituye un nuevo enfoque respecto a los mecanismos de control del comportamiento y la biología de las células madre neurales.

El CC es un nicho de NSC en el que las condiciones ambientales externas a las que está sometido el organismo modulan los procesos de neurogénesis a través de la actividad neuronal del órgano. La hipoxia constituye la señal extrínseca que modifica la actividad neuronal y cuando la tensión de oxígeno disminuye en la sangre, las células neuronales quimiosensoras, las células tipo I, se despolarizan y liberan sus vesículas con neurotransmisores y factores neuromoduladores. Estas moléculas activan las fibras sensoriales aferentes para desencadenar la respuesta ventilatoria aguda mediante la *sinapsis quimio-sensorial* propia de este órgano. Por otro lado, los neurotransmisores y neuromoduladores liberados al espacio sináptico también activan a las CMCC mediante la *sinapsis quimio-proliferativa* descrita anteriormente, que comunica células de ambos extremos del linaje celular. De esta manera, la población de elementos maduros puede influenciar sobre los elementos



indiferenciados para conseguir un equilibrio en el desarrollo de la función del órgano. El mecanismo establecido para el CC demuestra cómo los distintos elementos de un nicho neurogénico se coordinan para permitir al tejido adaptarse a situaciones fisiológicas cambiantes.



**Figura 40. Resumen gráfico que ilustra la hipótesis de la sinapsis quimi-proliferativa en el CC.** El gráfico muestra los dos tipos de sinapsis descritos en el CC, la sinapsis sensorial formada entre las células glómicas y las terminaciones nerviosas aferentes y la sinapsis quimi-proliferativa establecida entre el progenitor y la célula glómica madura del órgano.

### 3 La ET-1 como transmisor en la *sinapsis quimi-proliferativa*

La actividad y el comportamiento de las NSC se encuentran influenciados por diferentes factores derivados del nicho en el que residen (Wagers, 2012). Se han descrito multitud de moléculas como FGF-2, EPO, VEGF, BDNF, NGF, BMP, PEDF, entre otras, (Lim et al., 2000; Jin et al., 2002; Ramirez-Castillejo et al., 2006; Schwindt et al., 2009), que influyen de manera determinante en la biología de las NSC, participando en procesos como la supervivencia, la proliferación o la diferenciación celular. El sistema vascular ha demostrado ser un elemento destacado en la regulación de los nichos neurogénicos, debido a su función productora y distribuidora de moléculas de señalización (Ramirez-Castillejo et al., 2006; Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008; Mendez-Ferrer et al., 2009). Los factores reguladores también pueden ser secretados por las células que forman parte del parénquima del nicho que acompaña a las NSC. Los fibroblastos de la matriz celular, los astrocitos o las neuronas proporcionan señales que ayudan al mantenimiento de la función neurogénica (Miller and Gauthier-Fisher, 2009; Wang and Wagers, 2011; Wagers, 2012; Berg et al., 2013). Uno de los objetivos de este trabajo ha sido identificar los factores implicados en la activación de las CMCC. Los datos discutidos en el apartado anterior, demuestran que las células glómicas del CC juegan un papel decisivo en el proceso de activación de las CMCC. Por ello, los factores liberados por estas células en respuesta a hipoxia son candidatos idóneos para llevar a cabo la activación de la proliferación de sus propios progenitores.

Los estudios realizados sobre el nicho neurogénico del CC han permitido descubrir que el péptido vasoactivo ET-1 posee un potente efecto mitogénico sobre

los progenitores del CC, incrementando la supervivencia y la proliferación de estas células *in vitro*. Igualmente, parece que la ET-1 está involucrada en la hiperplasia ocurrida *in vivo* en este órgano bajo condiciones de hipoxia crónica. Estos resultados concuerdan y completan estudios anteriores en los que se había sugerido una posible acción de la ET-1 en la respuesta ventilatoria del CC y en la plasticidad del órgano (McQueen et al., 1995; Paciga et al., 1999; Chen et al., 2002).

ET-1 ha sido la única sustancia, de entre todos los factores neurovasculares examinados, que produjo un efecto potente y reproducible sobre el cultivo de CMCC. Otras moléculas, como EPO, dopamina y ATP, presentaron cierto efecto en algunos de los experimentos, pero los resultados finales no fueron concluyentes. El análisis del efecto de la ET-1 sobre la activación de progenitores se realizó sobre el cultivo de neuroesferas primarias, lo cual es una medida indirecta de la capacidad de auto-renovación y proliferación de las células madre. ET-1 provocó un aumento sustancial en el número y el tamaño de las neuroesferas primarias. Sin embargo, la obtención de neuroesferas secundarias de CC resulta técnicamente compleja debido a la difícil dispersión enzimática de estas estructuras y a la poca capacidad de auto-renovación detectada en estas células. Para salvar esta limitación se cuantificó la proliferación de los progenitores Nestina+ mediante el marcador de división Ki67. ET-1 incrementó la proliferación de los progenitores en la neuroesfera demostrando un papel mitogénico en los progenitores del CC.

El péptido ET-1 se encuentra entre las sustancias sintetizadas y liberadas por las células glómicas. Se piensa que podría formar parte de la carga de las vesículas secretoras de estas células junto con los diferentes neurotransmisores y péptidos neuromoduladores descritos. Experimentos utilizando radiomarcaje e inmunocitoquímica (McQueen et al., 1995; Chen et al., 2002) han mostrado la presencia de ET-1 y ET-RA en los glomérulos del CC. Sin embargo, el CC es rico en células endoteliales que también expresan ET-1, lo que podría causar confusión en los resultados. En la presente tesis doctoral, se ha utilizado una combinación de técnicas inmunocitoquímicas, de citometría de flujo y de biología molecular que han aportado pruebas inequívocas de que ET-1 se sintetiza en las células glómicas del CC y que este factor se sobre-expresa en condiciones de hipoxia.

En cuanto a la ruta de señalización molecular, los análisis presentados en este trabajo sugieren que la ET-1 lleva a cabo su acción en el CC actuando a través de sus receptores canónicos, ET-RA y ET-RB, debido a que la inhibición de éstos provocó una reducción de los efectos. Se ha observado también que el tratamiento con ET-1 lleva a la inducción del gen *c-myc*, un efector de la ruta canónica que media los efectos proliferativos de las endotelinas. La adición exógena de ET-1 provoca sobre-expresión del receptor tipo B en los progenitores del CC, sugiriendo un papel destacado para este receptor. También hemos analizado la expresión de los receptores de endotelina en las distintas células del CC, incluyendo las células sustentaculares, que se habían ignorado a este respecto en estudios previos. Hemos demostrado que los receptores tipo A se expresan no sólo en las células tipo I, sino también en las células tipo II. Más significativo aún fue encontrar que el receptor de endotelina tipo B se expresa abundantemente en todas las CMCC, mientras sólo es expresado en menos del 3% de las células glómicas. De acuerdo con estas observaciones, se sabe que el receptor tipo B es la forma predominante en astrocitos (Koyama and Michinaga, 2012), células que comparten el mismo linaje GFAP positivo con las células madre neurales del cerebro y del CC (Pardal et al., 2007; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009) y que dichas células son sensibles al efecto mitogénico de ET-1.



Los resultados aquí presentados concluyen que ET-1 y el receptor ET-RA se expresan en las células glómicas, y que dicha expresión se incrementa en condiciones de hipoxia. También demostramos que ET-1 es capaz de inducir la proliferación de las CMCC, y que estas células expresan preferentemente el receptor ET-RB. Estos datos, tomados en conjunto con el concepto de *sinapsis quimio-proliferativa* expuesto en el apartado anterior, sugieren fuertemente que la ET-1 podría ser una de las moléculas de señalización liberada por las células glómicas, capaz de ejercer como mediador en la sinapsis formada entre la célula glómica y la célula madre, induciendo la activación proliferativa de estas últimas en respuesta a hipoxia.

#### 4 Papel de la sinapsis quimi-proliferativa en la aclimatación a la hipoxia crónica

El cuerpo carotídeo (CC) tiene un papel importante en el control reflejo de la respiración en humanos. Individuos con ablación bilateral del órgano muestran una abolición permanente de la respuesta ventilatoria a la hipoxia (Timmers et al., 2003). El CC es también esencial para la aclimatación a la hipoxia crónica, una condición que afecta a millones de personas que viven o viajan a altitudes elevadas, y por lo tanto están expuestos a baja presión atmosférica y bajo contenido de O<sub>2</sub>. También existen patologías altamente prevalentes en humanos, tales como la insuficiencia cardíaca congestiva o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en las que aparece hipoxemia crónica severa debido a una reducción en la capacidad de intercambio de O<sub>2</sub> entre el aire y los capilares pulmonares. La supervivencia en condiciones de hipoxia crónica requiere la activación del CC y el crecimiento del órgano para potenciar el impulso respiratorio necesario para la activación sostenida del centro respiratorio (Powell et al., 1998; Joseph and Pequignot, 2009). Las personas que no se adaptan bien a la hipoxia crónica desarrollan disfunciones neurológicas y cardiopulmonares, y otras morbilidades severas que pueden conducir a la muerte. Los datos presentados aquí indican que las células glómicas son los elementos presinápticos sensibles al O<sub>2</sub> que median la activación del CC tanto en la hipoxia aguda (sinapsis quimio-sensorial) como en la hipoxia crónica (sinapsis quimio-proliferativa). Basándose en estos hallazgos, el desarrollo de una prueba funcional que evalúe la capacidad de respuesta a la hipoxia del CC podría ser de valor para identificar a las personas intolerantes a la hipoxia. Además, como las moléculas y las vías intracelulares implicadas son diferentes en los dos tipos de sinapsis, el desarrollo de una estrategia farmacológica selectiva podría tener una importante aplicación terapéutica.

#### 5 Regulación del destino celular por factores del nicho del cuerpo carotídeo

Las células sustentaculares han sido identificadas recientemente como las células madre del cuerpo carotídeo (CMCC) (Pardal et al., 2007). A estas células, que forman alrededor del 15% del parénquima celular del órgano quimiorreceptor, se les había atribuido una función de acompañamiento y sostén, por lo que la mayoría de las investigaciones no profundizaban demasiado en el estudio de su biología. Para llegar a un mejor entendimiento de las características de las CMCC, se hacen necesarios estudios moleculares más exhaustivos, que permitan la identificación de genes, marcadores y vías de señalización específicas de estas

células. En el presente trabajo hemos abordado este objetivo aplicando técnicas de análisis de expresión génica por microarrays sobre poblaciones enriquecidas en progenitores. Debido al desconocimiento de marcadores de membrana de células sustentaculares, útiles para la separación celular por citometría de flujo, no hemos podido llevar a cabo el estudio de expresión en poblaciones puras. Esto nos ha llevado a utilizar el ensayo de neuroesferas, que ha resultado ser una aproximación relevante para obtener muestras, aunque no puras, con alto porcentaje de progenitores.

Recapitulando todos los conocimientos obtenidos sobre los parámetros físico-químicos que modulan el nicho neurogénico del CC, hemos conseguido encontrar las señales adecuadas para amplificar *in vitro* la población de progenitores y obtener la biomasa necesaria para experimentos moleculares. Se ha recurrido a la combinación de tres estímulos: ET-1, PO<sub>2</sub> y mitógenos (EGF, FGF-2 e IGF-1). La misma muestra de células, bajo las diferentes condiciones de cultivo, se ha comportado de manera muy distinta, formando acúmulos de progenitores en un caso, y acúmulos de células neuronales en otro.

Como se ha expuesto anteriormente (ver apartado 3.2 del capítulo de “Resultados”), la hipoxia tiene un efecto potente sobre la diferenciación dopaminérgica de las células del CC. Los resultados obtenidos en el análisis del tamaño y la expresión de Nestina en las neuroesferas cultivadas en hipoxia han mostrado que este estímulo no parece afectar a la proliferación de los progenitores, contrariamente a lo encontrado en el nicho neurogénico del hipocampo (Panchision, 2009; Suda et al.). Sin embargo, sí que induce de manera determinante la aparición de células neuronales dopaminérgicas en las neuroesferas, tal y como ocurre en otros tipos de progenitores neurales (Morrison et al., 2000; Storch et al., 2001).

El análisis de los mitógenos sobre el cultivo de células madre del CC ha revelado que estos factores actúan del mismo modo que en otras poblaciones de progenitores. La presencia de mitógenos promueven la proliferación y supervivencia de las células madre, manteniéndolas en un estado indiferenciado (Reynolds and Rietze, 2005). Al mismo tiempo, también interfieren en el proceso de diferenciación, desviándola del linaje neuronal (Doetsch et al., 2002; Schwindt et al., 2009; Costa et al., 2011). Las células madre de CC cultivadas en ausencia de mitógenos forman principalmente células TH+. Los progenitores parecen diferenciarse rápidamente sin apenas amplificar su población, por lo que se obtienen acúmulos de células TH+, donde pueden identificarse alguna que otra célula Nestina+. Sin embargo, la adición de IGF-1, FGF-2 y EGF hace que la población de progenitores se amplifique antes de que se diferencien hacia células neuronales, generándose neuroesferas con alto porcentaje de células Nestina+. Algunos progenitores se diferencian a células neuronales incluso en presencia de mitógenos. Esta maduración puede deberse a que las células madre proliferen y a su vez vayan surgiendo progenitores restringidos hacia linaje neuronal, o al agotamiento de los mitógenos en el medio de cultivo.

La ET-1 es la otra molécula utilizada para la obtención de las muestras ricas en progenitores. La razón principal de su uso en estos experimentos se apoya en que este péptido interfiere en la diferenciación dopaminérgica de los progenitores del CC. Los resultados obtenidos en nuestros estudios muestran que ET-1 disminuye la presencia de *blebs* en las neuroesferas. Este efecto puede deberse a que ET-1 favorece la proliferación de las distintas poblaciones celulares del núcleo de la neuroesfera, incluidos los progenitores, y mantiene el estado indiferenciado de los mismos. Este factor también podría estar actuando desviando la

especificación de los progenitores neurales del linaje neuronal, restringiéndola hacia células con un fenotipo mesectodérmico. La acción concreta de este factor sobre los diferentes tipos celulares del CC deberá ser elucidado en futuras investigaciones.

Hemos utilizado ET-1, IGF-1, FGF-2 y EGF e hipoxia al 3% de O<sub>2</sub> para obtener dos tipos diferentes de muestras procedentes del cultivo de CMCC. Las células cultivadas en presencia de ET-1, mitógenos y al 21% de O<sub>2</sub>, han generado neuroesferas enriquecidas en progenitores, a las que hemos llamado *neuroesferas indiferenciadas* (NSundiff). Los cultivos de células del CC expuestos al 3% de O<sub>2</sub> sin mitógenos y en ausencia de ET-1 han formado acúmulos de células TH+, donde sólo se han observado muy pocas células Nestina+. Estos acúmulos los hemos llamado *neuroesferas diferenciadas* (NSdiff). La capacidad de controlar el destino celular de los progenitores del CC, manejando señales extrínsecas propias del microambiente donde residen, refleja la gran plasticidad que tienen estas células *in situ*.

## 6 Perfil genético de las células madre del cuerpo carotídeo

El estudio genético de las CMCC se ha llevado a cabo mediante el análisis de microarrays que compara las dos poblaciones de neuroesferas obtenidas mediante la aplicación de los factores ET-1, mitógenos y PO<sub>2</sub>. Los microarrays confirman que el efecto coordinado de los tres estímulos resulta en la obtención de dos tipos de muestras: i) una con fenotipo más indiferenciado, con alto potencial de proliferación y que expresa genes propios de progenitores y células madre (NSundiff); y ii) otra altamente enriquecida en células diferenciadas neuronales que expresan genes de sistema nervioso y fisiología neuronal (NSdiff). Los datos muestran que numerosos genes utilizados como marcadores para identificar células madre, como *Egfr*, *Sema3a*, o *Fzd1*, aparecen sobreexpresados en la muestra NSundiff, confirmando que esta población refleja un mayor grado de indiferenciación. Por contraposición, genes característicos de células neuronales, como *Ddc*, *Adora2A*, *Drd2*, o *Syp*, aparecen altamente sobreexpresados en la muestra NSdiff.

En los datos del análisis genético hemos advertido que las diferencias de expresión (FCH, *fold change*) correspondientes a genes encontrados en la población NSundiff son bastante inferiores a aquellos encontrados en NSdiff. Esto sugiere que ambas muestras se originan de los mismos progenitores multipotentes del CC, y que estos dan lugar a células cada vez más restringidas que continúan expresando, aunque en menor medida, algunos genes propios de células indiferenciadas. Sin embargo, los marcadores de un fenotipo neuronal más diferenciado se adquieren con el tiempo y comienzan a aparecer más rápidamente en la muestra más diferenciada, estando casi ausentes en NSundiff, por lo que las diferencias en FCH son mucho mayores.

El análisis de microarrays nos ha permitido recopilar información acerca de las vías canónicas presentes en cada una de las muestras gracias al estudio realizado con el *software* IPA. En la muestra indiferenciada, aparecen rutas asociadas a la biología de las células madre, como la vía Wnt/  $\beta$ -catenina, de gran importancia en el mantenimiento de la multipotencia de células madre de la cresta neural (Kleber et al., 2005), las vías PTEN, Sonic Hedgehog o PDGF. Incluso aparecen representadas rutas que recalcan la multipotencia de estas células como “Pluripotencia de ESC humanas” o “Hematopoyesis desde SC multipotentes”. El estado proliferativo de las células indiferenciadas también se traduce en la aparición

de vías ligadas a cáncer, como la señalización en el glioblastoma multiforme o en el glioma. Aparecen también vías moleculares asociadas a células derivadas de progenitores de la cresta neural, como osteoblastos, condrocitos o células mesenquimales. Curiosamente, aparece activa la vía HIF, aunque esta muestra se obtuvo bajo condiciones de normoxia. Esto puede ser debido a la ET-1, que ha sido sugerida que puede provocar la estabilización de Hif1 $\alpha$  en normoxia (Spinella et al., 2010). En las muestras NSdiff hemos obtenido rutas de señalización típicas de células neuronales, como la biosíntesis de catecolaminas. Se destaca también la señalización de los BMP, que promueven neurogénesis en las NCSC y en las NSC (Lim et al., 2000; Kleber et al., 2005).

En cuanto a la ontología genética, el software de análisis IPA resuelve en Categorías y Biofunciones la información contenida en el total de genes, sus niveles de expresión y la interacción entre estos descrita en la literatura. Las Biofunciones asociadas a la muestra NSundiff reflejan, en general, el origen de cresta neural que poseen estos progenitores. Entre las categorías más importantes se encuentran “desarrollo del sistema cardiovascular”, “desarrollo del sistema esquelético y muscular”, “desarrollo del tejido conectivo”, e incluso “desarrollo del sistema visual”. Todos estos tejidos derivan de células de la cresta neural (Figura 41). Además, como categoría más significativa aparece “movimiento celular”, una propiedad intrínseca a células de este origen embrionario. Destacamos la Biofunción “transición epitelio-mesénquima”, que aparece también en las vías canónicas de la población enriquecida en progenitores, y que de nuevo es típica de la cresta neural. Por consiguiente, se puede afirmar que las células madre del CC derivan de la cresta neural y conservan su carácter multipotente e indiferenciado en el CC adulto.

En el CC, al igual que sucede en otros nichos de células madre, el progenitor primario más indiferenciado da lugar a progenitores más restringidos, que producen los diferentes linajes, en el caso del CC, al menos neuronas y músculo liso (Pardal et al., 2007; Pardal et al., 2010). La condición de cultivo formada por la adición de ET-1 y mitógenos y una concentración atmosférica de O<sub>2</sub>, permitió inhibir la diferenciación de los progenitores hacia linaje neuronal. Por el contrario, la falta de mitógenos y la hipoxia aceleraron el proceso de diferenciación, obteniéndose cultivos casi homogéneos de células neuronales. Sin embargo, es difícil de establecer con exactitud qué tipos de células se están comparando en los microarrays, es decir, a qué nivel de maduración se encuentran las dos poblaciones. Las condiciones aplicadas a NSundiff pueden estar afectando de dos posibles maneras: i) haciendo que las células madre se mantengan indiferenciadas induciendo su auto-renovación, o ii) favoreciendo el avance por el linaje mesectodérmico e inhibiendo el linaje neuronal, dando lugar a un progenitor mesenquimatoso algo más restringido. Con los experimentos realizados hasta ahora, no podemos afirmar rotundamente cuál de las dos opciones es la correcta. Varios datos sugieren que en NSundiff se está favoreciendo el mantenimiento de las células madre en un estado indiferenciado, respetando su multipotencia. Por ejemplo, entre las biofunciones destacadas aparecen: “cáncer”, que indica un alto grado de indiferenciación, muchas categorías de “desarrollo”, lo que alude a un estado embrionario asociado también con la indiferenciación, e incluso vías canónicas propias de células madre pluri y multipotentes. Por otro lado, se sabe que el CC proviene de la región craneal de la cresta neural, que es la que produce más variedad de derivados, incluyendo células neurales, melanocitos, células neuroendocrinas y células mesectodérmicas (cartílago, osteocitos, tejido conectivo, etc.) (Dupin and Le Douarin, 2003). En el estudio de microarrays de CC aparecen todos estos derivados. Asumiendo que ocurriera la segunda opción, la célula madre

multipotente habría dado paso a un progenitor intermedio de carácter mesectodérmico, también multipotente, aunque alejado del linaje neural. En cualquier caso, la situación más probable es que la muestra NSundiff consista en una mezcla de progenitores indiferenciados y multipotentes, junto a progenitores ya más restringidos hacia linaje mesenquimal, que explicaría la expresión de genes más mesenquimatosos en la citada muestra.

	NEURAL CREST-DERIVED CELL TYPES			
	NEURONS AND GLIAL CELLS	PIGMENT CELLS	ENDOCRINE CELLS	MESENCHYMAL CELLS
Cranial	PNS neurons	Skin melanocytes	Carotid body cells	Craniofacial osteocytes and chondrocytes
	Sensory cranial ganglia, parasympathetic (ciliary) and enteric ganglia	Innear ear pigment cells	C cells (thyroid)	Smooth muscle cells (vascular and heart conotruncus)
	Satellite glial cells in PNS ganglia			Pericytes (brain)
	Schwann cells			Odontoblasts
	Ensheating olfactory cells			Adipocytes
Trunk	PNS neurons	Skin melanocytes	Adrenal-medullary cells	Dermal cells
Sensory ganglia (DRG), sympathetic and parasympathetic ganglia				Corneal cells (endothelium and stroma)
	Satellite glial cells in PNS ganglia			Endoneurial fibroblasts (mouse sciatic nerve)
	Schwann cells			

**Figura 41. Tipos celulares derivados de la cresta neural de vertebrados.** Adaptado de Dupin y Coelho-Aguiar, 2013.

En el campo de las células madre de la cresta neural se ha establecido un modelo de segregación de linaje celular a partir de células de la cresta neural cefálica (que incluye región troncal y craneal). Existe una célula madre común multipotente que da lugar a precursores intermediarios algo más restringidos, que formarán los progenitores unipotentes que producen finalmente cartílago, neuronas, glía, melanocitos, o células neuroendocrinas (Figura 42) (Baroffio et al., 1988; Dupin et al., 1990). Según nuestros datos obtenidos *in silico*, las células madre del CC estarían situadas en un nivel bastante alto en esta jerarquía, ya que, potencialmente, podrían dar lugar a casi todos los derivados propios de la región craneal.

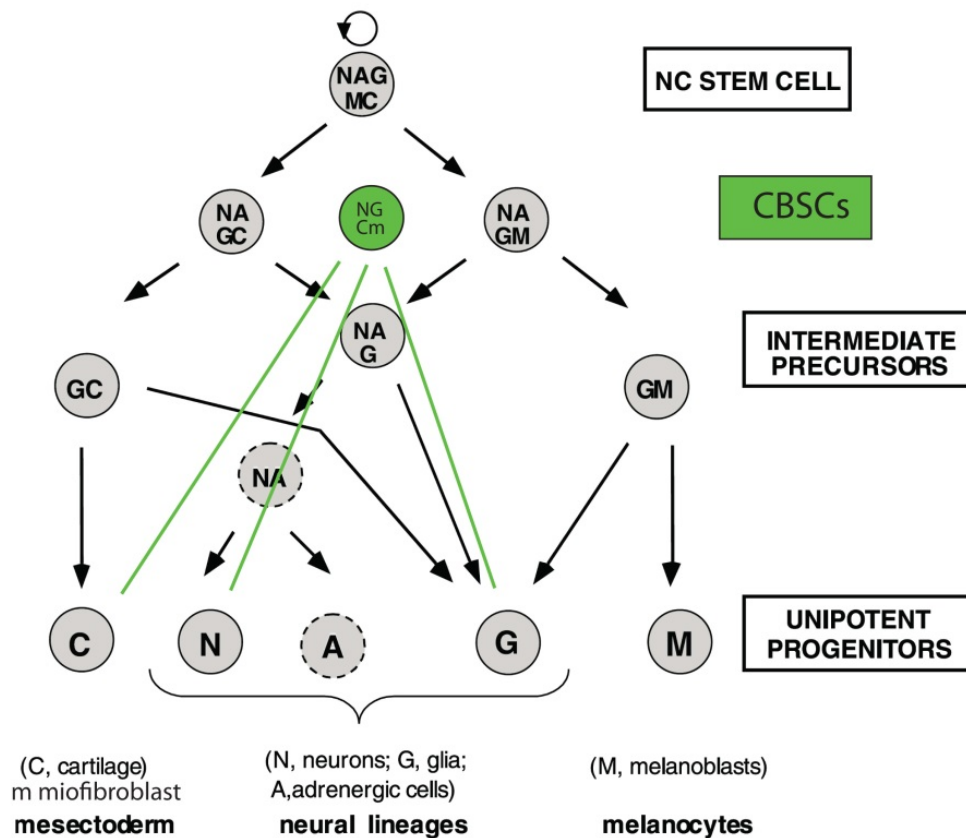
Aunque la cresta neural es una estructura transitoria en el embrión, algunos progenitores multipotentes han sido descritos en el individuo adulto (Kruger et al., 2002; Tomita et al., 2005; Yoshida et al., 2006; Li et al., 2007; Pardal et al., 2007; Davies et al., 2010), y tras su aislamiento y cultivo *in vitro*, dan lugar a los linajes celulares clásicos de la cresta neural, como neuronas, glía y miofibroblastos. En algunos casos también se han generado otros tipos de células mesenquimales. Las CMCC parecen poseer un amplio potencial de diferenciación. Se ha comprobado que pueden dar lugar a neuronas y glía *in vivo*, y miofibroblastos *in vitro*. Sin embargo, los resultados obtenidos en los estudios de expresión génica aquí



expuestos sugieren que estas células poseen aún mayor capacidad multipotente. Según estos datos, las CMCC expresan genes que les otorgaría la capacidad de formar distintos derivados mesenquimales, como hueso, cartílago, músculo liso, fibroblastos y endotelio vascular. Esta hipótesis deberá ser confirmada con futuros ensayos *in vitro* e *in vivo* que analicen el potencial real de dichas células.

#### Model for the segregation of cell lineages derived from the cephalic neural crest

(Adapted from Baroffio, Dupin and LeDouarin, 1991)



**Figura 42. Modelo de la segregación de linajes celulares derivados de la cresta neural cefálica.** El diagrama muestra los diferentes progenitores derivados de la misma célula madre de la cresta neural cultivada clonalmente. Los resultados son consistentes con la existencia de progenitores unipotentes derivados de una célula madre pluripotente a través de varios precusores oligopotentes. En verde se muestra el nivel de multipotencia hipotético donde se encontrarían las células madres del CC. Modificado de Dupin et al., 2001.

Como se ha explicado en el apartado 1.2 de la “Introducción”, las células de la cresta neural son la fuente de una amplia variedad de tipos celulares. Cómo se genera esta gran diversidad ha sido una pregunta importante en el campo, que está, hoy en día, comenzando a contestarse. Si todos los derivados surgen de un sólo tipo de célula madre multipotente o si la cresta neural premigratoria es un conjunto heterogéneo de distintos progenitores restringidos unipotentes, cada uno programado para dar un tipo de derivado, son las opciones propuestas. Asumiendo que la cresta neural estuviera formada por un grupo de progenitores unipotentes, se produciría una temprana segregación hacia precusores mesectodérmicos y precusores neurales. Actualmente, los diferentes estudios apoyan la idea de la existencia de heterogeneidad en las células de la cresta neural respecto a su potencial de proliferación y diferenciación, incluyendo progenitores multipotentes y precusores restringidos (Dupin and Coelho-Aguiar, 2013). Por lo tanto, las señales

apropiadas del ambiente son esenciales para promover la diferenciación hacia los distintos linajes. El CC es un ejemplo de nicho de progenitores multipotentes de la cresta neural que recibe distintas señales en el propio nicho para promover la diferenciación hacia uno u otro linaje. Este nicho apoya el concepto de la heterogeneidad en las células de la cresta neural, descartando la idea de que los progenitores estén ya restringidos hacia un solo linaje desde la etapa premigratoria.

Conocer los factores locales que influyen en la potencialidad de los progenitores de la cresta neural y que son responsables de su destino final de estas células, es de gran importancia para la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la multipotencia de estas células y facilita su posible utilización en terapia celular. Con nuestros experimentos de análisis de la expresión génica se ha demostrado que mediante el uso de factores como la tensión de O<sub>2</sub>, los mitógenos y la ET-1, es posible manipular el destino fenotípico de dichos progenitores.

Por último, otro de los fines de este proyecto ha sido encontrar marcadores de membrana que nos permitieran el aislamiento y caracterización de los progenitores y de las células glómicas del CC. Hemos identificado la metaloendopeptidasa de membrana CD10 como marcador de un tipo de progenitor que es capaz de formar neuroesferas en cultivo. Este hallazgo inicia un nuevo proyecto consistente en la caracterización de la población de células CD10+ en el CC. Por el contrario, no hemos podido hallar un marcador de membrana para las células tipo I. Aunque los receptores CD74 y A2a se expresan abundantemente en neuroesferas ricas en células neuronales, no se expresan en las células glómicas del CC *in vivo*. Resultados muy preliminares muestran que A2a parece marcar a las células de los *blebs* en las neuroesferas, sugiriendo que las células TH+ generadas a partir de neuroesferas tienen características diferentes a las células TH+ presentes en el tejido del CC. CD74 tampoco es expresado por las células TH+ del CC. Según la literatura, este receptor está presente en neuronas del ganglio estatoacústico, donde ayuda al crecimiento de neuritas (Bank et al., 2012). También se usa como marcador de célula madre mesenquimal (Ishii et al., 2005) y es el receptor para la citoquina MIF, implicada en proliferación celular (Cherry et al., 2003). Aunque no sabemos qué tipo celular está expresando CD74 en el CC, una posibilidad es que marque células neuronales en proceso de diferenciación, que todavía no hayan alcanzado el fenotipo TH+. También podríamos estar ante un marcador de progenitor neuronal restringido favorecido a bajas PO<sub>2</sub> que da lugar a las células TH+ de los *blebs*. Los experimentos presentados en esta tesis doctoral sobre los marcadores de membrana para las células glómicas no han sido concluidos y sus resultados son todavía muy preliminares.



# CONCLUSIONS

---

1. Carotid body growth in hypoxia is due, at least in part, to the activation of a population of multipotent adult neural stem cells. Stimulation during initial stages of exposure to hypoxia of this neural stem cell population does not seem to directly depend on oxygen tension or stabilization of HIF.
2. Oxygen-dependent stimulation of the carotid body neurogenic niche is mediated by activation of the oxygen-sensitive glomus cells, which establish chemical synaptic contacts with stem cells.
3. Endothelin-1 is a powerful activator of the proliferation of carotid body progenitor cells and has a role in the physiologic growth of the organ during hypoxia. Glomus cells produce endothelin-1 and express endothelin receptors, almost exclusively of the type A. In contrast, carotid body progenitor cells express preferably endothelin B receptors.
4. Communication between glomus cells and stem cells is likely mediated by endothelin-1 directly released by glomus cells in the synaptic-like structure which we have denoted as “chemo-proliferative synapse”.
5. Carotid body stem cells and mature neuron-like glomus cells can be distinguished by different genes and molecular pathways. The gene expression profile of adult carotid body stem cells demonstrates their neural crest origin, and suggests that they represent a partially compromised, but still pluripotent, neural crest progenitor.
6. CD10 emerges as a potential membrane marker to facilitate cell-sorting purification of carotid body progenitors.
7. Activation of stem cells by mature neuron-like glomus cells in the carotid body niche, represents one of the few examples in which modulation of stem cell proliferation and differentiation by physiological demand can be studied in detail.
8. Regulation of the carotid body neurogenic center by oxygen tension facilitates the understanding of the molecular and cellular mechanisms underlying acclimatization to sustained hypoxia. This could help in the management of patients presenting hypoxemia. Expansion of the carotid body stem cell population in vitro and their differentiation to dopaminergic cells, may be relevant to cell therapy studies in Parkinson disease.





# BIBLIOGRAFÍA

---

Abassi, Z.A., Tate, J.E., Golomb, E., and Keiser, H.R. (1992). Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* 20, 89-95.

Alfonso, J., Le Magueresse, C., Zuccotti, A., Khodosevich, K., and Monyer, H. (2012). Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell Stem Cell* 10, 76-87.

Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol* 136, 269-293.

Altman, J., and Das, G.D. (1965). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207, 953-956.

Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J.M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22, 629-634.

Alvarez-Buylla, A., and Lim, D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683-686.

Andang, M., Hjerling-Leffler, J., Moliner, A., Lundgren, T.K., Castelo-Branco, G., Nanou, E., Pozas, E., Bryja, V., Halliez, S., Nishimaru, H., *et al.* (2008). Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* 451, 460-464.

Arias-Stella, J., and Valcarcel, J. (1976). Chief cell hyperplasia in the human carotid body at high altitudes; physiologic and pathologic significance. *Hum Pathol* 7, 361-373.

Baker, S.A., Baker, K.A., and Hagg, T. (2004). Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* 20, 575-579.

Bank, L.M., Bianchi, L.M., Ebisu, F., Lerman-Sinkoff, D., Smiley, E.C., Shen, Y.C., Ramamurthy, P., Thompson, D.L., Roth, T.M., Beck, C.R., *et al.* (2012). Macrophage migration inhibitory factor acts as a neurotrophin in the developing inner ear. *Development* 139, 4666-4674.

Baroffio, A., Dupin, E., and Le Douarin, N.M. (1988). Clone-forming ability and differentiation potential of migratory neural crest cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5325-5329.

Battistini, B., Chailier, P., D'Orleans-Juste, P., Briere, N., and Sirois, P. (1993). Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* 14, 385-399.

Becker, A.J., Mc, C.E., and Till, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-454.

Beckervordersandforth, R., Tripathi, P., Ninkovic, J., Bayam, E., Lepier, A., Stempfhuber, B., Kirchhoff, F., Hirrlinger, J., Haslinger, A., Lie, D.C., *et al.* (2010). In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 744-758.

Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., *et al.* (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-776.

Berg, D.A., Belnoue, L., Song, H., and Simon, A. (2013). Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development* 140, 2548-2561.

Berg, D.A., Kirkham, M., Wang, H., Frisen, J., and Simon, A. (2011). Dopamine controls neurogenesis in the adult salamander midbrain in homeostasis and during regeneration of dopamine neurons. *Cell Stem Cell* 8, 426-433.

Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M.S., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landen, M., Druid, H., *et al.* (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74, 634-639.

Biebl, M., Cooper, C.M., Winkler, J., and Kuhn, H.G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291, 17-20.

Bin-Jaliah, I., Maskell, P.D., and Kumar, P. (2004). Indirect sensing of insulin-induced hypoglycaemia by the carotid body in the rat. *J Physiol* 556, 255-266.

Bisgard, G.E. (2000). Carotid body mechanisms in acclimatization to hypoxia. *Respir Physiol* 121, 237-246.

Bishop, T., Talbot, N.P., Turner, P.J., Nicholls, L.G., Pascual, A., Hodson, E.J., Douglas, G., Fielding, J.W., Smith, T.G., Demetriades, M., *et al.* (2013). Carotid body hyperplasia and enhanced ventilatory responses to hypoxia in mice with heterozygous deficiency of PHD2. *J Physiol* 591, 3565-3577.

Bixby, S., Kruger, G.M., Mosher, J.T., Joseph, N.M., and Morrison, S.J. (2002). Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* 35, 643-656.

Bonano, M., Tribulo, C., De Calisto, J., Marchant, L., Sanchez, S.S., Mayor, R., and Aybar, M.J. (2008). A new role for the Endothelin-1/Endothelin-A receptor signaling during early neural crest specification. *Dev Biol* 323, 114-129.

Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)* 85, 1301-1307.

Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 581, 3582-3591.

Braun, R.D., Lanzen, J.L., Snyder, S.A., and Dewhirst, M.W. (2001). Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H2533-2544.

Buckler, K.J., and Vaughan-Jones, R.D. (1998). Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells. *J Physiol* 513 ( Pt 3), 819-833.

Buffo, A., Vosko, M.R., Erturk, D., Hamann, G.F., Jucker, M., Rowitch, D., and Gotz, M. (2005). Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18183-18188.

Busuttil, R.A., Rubio, M., Dolle, M.E., Campisi, J., and Vijg, J. (2003). Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell* 2, 287-294.

Buttigieg, J., and Nurse, C.A. (2004). Detection of hypoxia-evoked ATP release from chemoreceptor cells of the rat carotid body. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 82-87.

Carlen, M., Meletis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabe-Heider, F., Yeung, M.S., Naldini, L., *et al.* (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 12, 259-267.

Cavalieri, B. (1966). *Geometria degli indivisibili* (Torino: Unione Tipografica).

Cipolleschi, M.G., Dello Sbarba, P., and Olivotto, M. (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82, 2031-2037.

Clozel, M., Breu, V., Burri, K., Cassal, J.M., Fischli, W., Gray, G.A., Hirth, G., Loffler, B.M., Muller, M., Neidhart, W., *et al.* (1993). Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* 365, 759-761.

Clozel, M., Breu, V., Gray, G.A., Kalina, B., Loffler, B.M., Burri, K., Cassal, J.M., Hirth, G., Muller, M., Neidhart, W., *et al.* (1994). Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 270, 228-235.

Corotto, F.S., Henegar, J.A., and Maruniak, J.A. (1993). Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* 149, 111-114.

Coskun, V., Wu, H., Bianchi, B., Tsao, S., Kim, K., Zhao, J., Biancotti, J.C., Hutnick, L., Krueger, R.C., Jr., Fan, G., *et al.* (2008). CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1026-1031.

Costa, M.R., Ortega, F., Brill, M.S., Beckervordersandforth, R., Petrone, C., Schroeder, T., Gotz, M., and Berninger, B. (2011). Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development* 138, 1057-1068.

Currle, D.S., and Gilbertson, R.J. (2008). The niche revealed. *Cell Stem Cell* 3, 234-236.

- Chambers, I., and Smith, A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 23, 7150-7160.
- Chell, J.M., and Frisen, J. (2012). Noisy neurons keep neural stem cells quiet. *Cell Stem Cell* 11, 282-284.
- Chen, H.L., Pistollato, F., Hoepfner, D.J., Ni, H.T., McKay, R.D., and Panchision, D.M. (2007a). Oxygen tension regulates survival and fate of mouse central nervous system precursors at multiple levels. *Stem Cells* 25, 2291-2301.
- Chen, J., Dinger, B., Jyung, R., Stensaas, L., and Fidone, S. (2003). Altered expression of vascular endothelial growth factor and FLK-1 receptor in chronically hypoxic rat carotid body. *Adv Exp Med Biol* 536, 583-591.
- Chen, J., He, L., Dinger, B., and Fidone, S. (2000). Pharmacological effects of endothelin in rat carotid body. Activation of second messenger pathways and potentiation of chemoreceptor activity. *Adv Exp Med Biol* 475, 517-525.
- Chen, J., He, L., Dinger, B., Stensaas, L., and Fidone, S. (2002). Role of endothelin and endothelin A-type receptor in adaptation of the carotid body to chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L1314-1323.
- Chen, J., He, L., Liu, X., Dinger, B., Stensaas, L., and Fidone, S. (2007b). Effect of the endothelin receptor antagonist bosentan on chronic hypoxia-induced morphological and physiological changes in rat carotid body. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L1257-1262.
- Cherry, R.J., Morrison, I.E., Karakikes, I., Barber, R.E., Silkstone, G., and Fernandez, N. (2003). Measurements of associations of cell-surface receptors by single-particle fluorescence imaging. *Biochem Soc Trans* 31, 1028-1031.
- Chiquet-Ehrismann, R., Kalla, P., Pearson, C.A., Beck, K., and Chiquet, M. (1988). Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 53, 383-390.
- Christopher, M.J., Rao, M., Liu, F., Woloszynek, J.R., and Link, D.C. (2011). Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *J Exp Med* 208, 251-260.
- Davies, L.C., Locke, M., Webb, R.D., Roberts, J.T., Langley, M., Thomas, D.W., Archer, C.W., and Stephens, P. (2010). A multipotent neural crest-derived progenitor cell population is resident within the oral mucosa lamina propria. *Stem Cells Dev* 19, 819-830.
- Davis, A.A., and Temple, S. (1994). A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372, 263-266.
- Diaz-Castro, B., Pintado, C.O., Garcia-Flores, P., Lopez-Barneo, J., and Piruat, J.I. (2012). Differential impairment of catecholaminergic cell maturation and survival by genetic mitochondrial complex II dysfunction. *Mol Cell Biol* 32, 3347-3357.
- Doetsch, F. (2003a). The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 6, 1127-1134.

- Doetsch, F. (2003b). A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13, 543-550.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999a). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999b). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11619-11624.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36, 1021-1034.
- Doetsch, F., and Scharff, C. (2001). Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain Behav Evol* 58, 306-322.
- Dranovsky, A., Picchini, A.M., Moadel, T., Sisti, A.C., Yamada, A., Kimura, S., Leonardo, E.D., and Hen, R. (2011). Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. *Neuron* 70, 908-923.
- Duchen, M.R., Caddy, K.W., Kirby, G.C., Patterson, D.L., Ponte, J., and Biscoe, T.J. (1988). Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body. *Neuroscience* 26, 291-311.
- Dupin, E., Baroffio, A., Dulac, C., Cameron-Curry, P., and Le Douarin, N.M. (1990). Schwann-cell differentiation in clonal cultures of the neural crest, as evidenced by the anti-Schwann cell myelin protein monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1119-1123.
- Dupin, E., and Coelho-Aguiar, J.M. (2013). Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells. *Cytometry A* 83, 38-47.
- Dupin, E., and Le Douarin, N.M. (2003). Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene* 22, 3016-3023.
- Dupin, E., Real, C., and Ledouarin, N. (2001). The neural crest stem cells: control of neural crest cell fate and plasticity by endothelin-3. *An Acad Bras Cienc* 73, 533-545.
- Dupin, E., and Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol* 366, 83-95.
- Edwards, C., Heath, D., and Harris, P. (1970). The carotid body in myocardial hypertrophy and pulmonary emphysema. *J Pathol* 101, P2-3.
- Ehninger, A., and Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med* 208, 421-428.

Ehrenreich, H., Anderson, R.W., Ogino, Y., Rieckmann, P., Costa, T., Wood, G.P., Coligan, J.E., Kehrl, J.H., and Fauci, A.S. (1991). Selective autoregulation of endothelins in primary astrocyte cultures: endothelin receptor-mediated potentiation of endothelin-1 secretion. *New Biol* 3, 135-141.

Erecinska, M., and Silver, I.A. (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 128, 263-276.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.

Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisen, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156, 1072-1083.

Fidone, S.J., Gonzalez C. (1986). Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. In *Handbook of Physiology, Respiration*, N.C.a.J.G.W. (Eds.), ed. (Washintong, DC.).

Firth, J.D., and Ratcliffe, P.J. (1992). Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J Clin Invest* 90, 1023-1031.

Fitzgerald RS, L.S. (1986). Reflex responses to chemoreceptor stimulation. In *Handbook of Physiology The Respiratory System Control of Breathing*, A.P.S. (ed), ed. (Baltimore, M), pp. 313-362.

Fitzgerald, R.S., Shirahata, M., Chang, I., and Kostuk, E. (2009). The impact of hypoxia and low glucose on the release of acetylcholine and ATP from the incubated cat carotid body. *Brain Res* 1270, 39-44.

Font, E., Desfilis, E., Perez-Canellas, M.M., and Garcia-Verdugo, J.M. (2001). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behav Evol* 58, 276-295.

Font, E., Garcia-Verdugo, J.M., Alcantara, S., and Lopez-Garcia, C. (1991). Neuron regeneration reverses 3-acetylpyridine-induced cell loss in the cerebral cortex of adult lizards. *Brain Res* 551, 230-235.

Fuchs, E., Tumber, T., and Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116, 769-778.

Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.

Gammill, L.S., and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 4, 795-805.

Garcia-Fernandez, M., Ortega-Saenz, P., Castellano, A., and Lopez-Barneo, J. (2007). Mechanisms of low-glucose sensitivity in carotid body glomus cells. *Diabetes* 56, 2893-2900.



Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., and Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589-593.

Ghajar, C.M., Peinado, H., Mori, H., Matei, I.R., Evason, K.J., Brazier, H., Almeida, D., Koller, A., Hajjar, K.A., Stainier, D.Y., *et al.* (2013). The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol* 15, 807-817.

Gould, E., Reeves, A.J., Graziano, M.S., and Gross, C.G. (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286, 548-552.

Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., Galli, R., Verdugo, J.M., Herrera, D.G., and Vescovi, A.L. (2002). Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22, 437-445.

Gritti, A., Galli R. and Vescovi AL. (2001). Cultures of Stem Cells of the Central Nervous System. In *Protocols for Neural Cell Culture*, A.R. Sergey Fedoroff, ed. (Humana Press).

Gronthos, S., Zannettino, A.C., Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortessidis, A., and Simmons, P.J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116, 1827-1835.

Hama, H., Sakurai, T., Kasuya, Y., Fujiki, M., Masaki, T., and Goto, K. (1992). Action of endothelin-1 on rat astrocytes through the ETB receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 355-362.

Harik, S.I., Sharma, V.K., Wetherbee, J.R., Warren, R.H., and Banerjee, S.P. (1981). Adrenergic and cholinergic receptors of cerebral microvessels. *J Cereb Blood Flow Metab* 1, 329-338.

Harland, S.P., Kuc, R.E., Pickard, J.D., and Davenport, A.P. (1998). Expression of endothelin(A) receptors in human gliomas and meningiomas, with high affinity for the selective antagonist PD156707. *Neurosurgery* 43, 890-898; discussion 898-899.

He, L., Chen, J., Dinger, B., Stensaas, L., and Fidone, S. (1996). Endothelin modulates chemoreceptor cell function in mammalian carotid body. *Adv Exp Med Biol* 410, 305-311.

Heath, D., Smith, P., and Jago, R. (1982). Hyperplasia of the carotid body. *J Pathol* 138, 115-127.

Hempleman, S.C., and Warburton, S.J. (2013). Comparative embryology of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 185, 3-8.

Hoglinger, G.U., Rizk, P., Muriel, M.P., Duyckaerts, C., Oertel, W.H., Caille, I., and Hirsch, E.C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7, 726-735.

Hosoda, K., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Baynash, A.G., Cheung, J.C., Giaid, A., and Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79, 1267-1276.

Ibi, D., Takuma, K., Koike, H., Mizoguchi, H., Tsuritani, K., Kuwahara, Y., Kamei, H., Nagai, T., Yoneda, Y., Nabeshima, T., *et al.* (2008). Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J Neurochem* 105, 921-932.

Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., Kawaguchi, H., Sugiyama, M., Kamata, N., Iwata, T., *et al.* (2005). Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 297-303.

Jackson, E.L., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors. *Cells Tissues Organs* 188, 212-224.

Jiang, X., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P., and Sucov, H.M. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127, 1607-1616.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.

Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11946-11950.

Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisen, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.

Joseph, V., and Pequignot, J.M. (2009). Breathing at high altitude. *Cell Mol Life Sci* 66, 3565-3573.

Kaelin, W.G., Jr., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 30, 393-402.

Kameda, Y. (2002). Carotid body and glomus cells distributed in the wall of the common carotid artery in the bird. *Microsc Res Tech* 59, 196-206.

Kameda, Y. (2005). Mash1 is required for glomus cell formation in the mouse carotid body. *Dev Biol* 283, 128-139.

Kameda, Y., Nishimaki, T., Takeichi, M., and Chisaka, O. (2002). Homeobox gene *hoxa3* is essential for the formation of the carotid body in the mouse embryos. *Dev Biol* 247, 197-209.

Kameda, Y., Saitoh, T., Nemoto, N., Katoh, T., and Iseki, S. (2012). *Hes1* is required for the development of the superior cervical ganglion of sympathetic trunk and the carotid body. *Dev Dyn* 241, 1289-1300.

Kameda, Y., Yamatsu, Y., Kameya, T., and Frankfurter, A. (1994). Glomus cell differentiation in the carotid body region of chick embryos studied by neuron-specific class III beta-tubulin isotype and Leu-7 monoclonal antibodies. *J Comp Neurol* 348, 531-543.

- Kempermann, G. (2002). Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 22, 635-638.
- Kempermann, G., and Gage, F.H. (2000). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp* 231, 220-235; discussion 235-241, 302-226.
- Kim, H.J., and Sun, W. (2012). Adult neurogenesis in the central and peripheral nervous systems. *International neuroourology journal* 16, 57-61.
- Kleber, M., Lee, H.Y., Wurdak, H., Buchstaller, J., Riccomagno, M.M., Ittner, L.M., Suter, U., Epstein, D.J., and Sommer, L. (2005). Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. *J Cell Biol* 169, 309-320.
- Kondo, H. (1975). A light and electron microscopic study on the embryonic development of the rat carotid body. *Am J Anat* 144, 275-293.
- Kornack, D.R., and Rakic, P. (2001). Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294, 2127-2130.
- Koyama, Y., and Michinaga, S. (2012). Regulations of astrocytic functions by endothelins: roles in the pathophysiological responses of damaged brains. *J Pharmacol Sci* 118, 401-407.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32, 149-184.
- Krimer, L.S., Muly, E.C., 3rd, Williams, G.V., and Goldman-Rakic, P.S. (1998). Dopaminergic regulation of cerebral cortical microcirculation. *Nat Neurosci* 1, 286-289.
- Kruger, G.M., Mosher, J.T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., and Morrison, S.J. (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35, 657-669.
- Kruger, G.M., Mosher, J.T., Tsai, Y.H., Yeager, K.J., Iwashita, T., Gariepy, C.E., and Morrison, S.J. (2003). Temporally distinct requirements for endothelin receptor B in the generation and migration of gut neural crest stem cells. *Neuron* 40, 917-929.
- L'Episcopo, F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M.C., Deleidi, M., Serapide, M.F., Pluchino, S., and Marchetti, B. (2012). Plasticity of subventricular zone neuroprogenitors in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse model of Parkinson's disease involves cross talk between inflammatory and Wnt/beta-catenin signaling pathways: functional consequences for neuroprotection and repair. *J Neurosci* 32, 2062-2085.
- Lahav, R., Dupin, E., Lecoin, L., Glavieux, C., Champeval, D., Ziller, C., and Le Douarin, N.M. (1998). Endothelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14214-14219.
- Le Douarin, N., Le Lievre, C., and Fontaine, J. (1972). [Experimental research on the embryologic origin of the carotid body in birds]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 275, 583-586.

- Le Douarin, N.M. (1980). The ontogeny of the neural crest in avian embryo chimaeras. *Nature* 286, 663-669.
- Le Douarin, N.M. (1986a). Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. *Science* 231, 1515-1522.
- Le Douarin, N.M. (1986b). Investigations on the neural crest. Methodological aspects and recent advances. *Ann N Y Acad Sci* 486, 66-86.
- Le Lievre, C.S., and Le Douarin, N.M. (1975). Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 34, 125-154.
- Lee, J.H., Bhang, D.H., Beede, A., Huang, T.L., Stripp, B.R., Bloch, K.D., Wagers, A.J., Tseng, Y.H., Ryeom, S., and Kim, C.F. (2014). Lung Stem Cell Differentiation in Mice Directed by Endothelial Cells via a BMP4-NFATc1-Thrombospondin-1 Axis. *Cell* 156, 440-455.
- Li, H.Y., Say, E.H., and Zhou, X.F. (2007). Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells* 25, 2053-2065.
- Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.
- Liu, L., and Simon, M.C. (2004). Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol Ther* 3, 492-497.
- Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F., and Bordey, A. (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8, 1179-1187.
- Lo, L., and Anderson, D.J. (1995). Postmigratory neural crest cells expressing c-RET display restricted developmental and proliferative capacities. *Neuron* 15, 527-539.
- Loeffler, M., Birke, A., Winton, D., and Potten, C. (1993). Somatic mutation, monoclonality and stochastic models of stem cell organization in the intestinal crypt. *J Theor Biol* 160, 471-491.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2074-2077.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981.
- Lopez-Barneo, J. (2003). Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Curr Opin Neurobiol* 13, 493-499.
- Lopez-Barneo, J., Lopez-Lopez, J.R., Urena, J., and Gonzalez, C. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K<sup>+</sup> current modulated by PO<sub>2</sub> in type I chemoreceptor cells. *Science* 241, 580-582.

- Lopez-Barneo, J., Ortega-Saenz, P., Pardal, R., Pascual, A., and Piruat, J.I. (2008). Carotid body oxygen sensing. *Eur Respir J* 32, 1386-1398.
- Lopez-Barneo, J., Pardal, R., and Ortega-Saenz, P. (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* 63, 259-287.
- Lotz, M.M., Burdsal, C.A., Erickson, H.P., and McClay, D.R. (1989). Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J Cell Biol* 109, 1795-1805.
- Lovenberg, W., and Miller, R.C. (1990). Endothelin: a review of its effects and possible mechanisms of action. *Neurochem Res* 15, 407-417.
- Mason, H.A., Ito, S., and Corfas, G. (2001). Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci* 21, 7654-7663.
- McGregor, K.H., Gil, J., and Lahiri, S. (1984). A morphometric study of the carotid body in chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 57, 1430-1438.
- McQueen, D.S., Dashwood, M.R., Cobb, V.J., Bond, S.M., Marr, C.G., and Spyer, K.M. (1995). Endothelins and rat carotid body: autoradiographic and functional pharmacological studies. *J Auton Nerv Syst* 53, 115-125.
- Mendez-Ferrer, S., Chow, A., Merad, M., and Frenette, P.S. (2009). Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells. *Current opinion in hematology* 16, 235-242.
- Mendez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 452, 442-447.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26, 7907-7918.
- Merkle, F.T., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17528-17532.
- Milsom, W.K., and Burleson, M.L. (2007). Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 157, 4-11.
- Miller, F.D., and Gauthier-Fisher, A. (2009). Home at last: neural stem cell niches defined. *Cell Stem Cell* 4, 507-510.
- Ming, G.L., and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687-702.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3, 265-278.

Mitchell, J.A., and Yochim, J.M. (1968). Intrauterine oxygen tension during the estrous cycle in the rat: its relation to uterine respiration and vascular activity. *Endocrinology* 83, 701-705.

Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T., and Quinones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150-161.

Montoro, R.J., Urena, J., Fernandez-Chacon, R., Alvarez de Toledo, G., and Lopez-Barneo, J. (1996). Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J Gen Physiol* 107, 133-143.

Morrison, S.J., Csete, M., Groves, A.K., Melega, W., Wold, B., and Anderson, D.J. (2000). Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J Neurosci* 20, 7370-7376.

Morrison, S.J., Shah, N.M., and Anderson, D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287-298.

Morrison, S.J., White, P.M., Zock, C., and Anderson, D.J. (1999). Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96, 737-749.

Nagoshi, N., Shibata, S., Kubota, Y., Nakamura, M., Nagai, Y., Satoh, E., Morikawa, S., Okada, Y., Mabuchi, Y., Katoh, H., *et al.* (2008). Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell* 2, 392-403.

Nakamaru, M., Tabuchi, Y., Rakugi, H., Nagano, M., and Ogihara, T. (1989). Actions of endothelin on adrenergic neuroeffector junction. *J Hypertens Suppl* 7, S132-133.

Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *Hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem* 276, 30467-30474.

Okano, H. (2002). Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 69, 698-707.

Ortega-Saenz, P., Pardal, R., Levitsky, K., Villadiego, J., Munoz-Manchado, A.B., Duran, R., Bonilla-Henao, V., Arias-Mayenco, I., Sobrino, V., Ordonez, A., *et al.* (2013). Cellular properties and chemosensory responses of the human carotid body. *J Physiol* 591, 6157-6173.

Paciga, M., Vollmer, C., and Nurse, C. (1999). Role of ET-1 in hypoxia-induced mitosis of cultured rat carotid body chemoreceptors. *Neuroreport* 10, 3739-3744.

Palmer, T.D., Takahashi, J., and Gage, F.H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8, 389-404.

Panchision, D.M. (2009). The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol* 220, 562-568.

Pardal, R., and Lopez-Barneo, J. (2002). Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci* 5, 197-198.



Pardal, R., Ortega-Saenz, P., Duran, R., and Lopez-Barneo, J. (2007). Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 131, 364-377.

Pardal, R., Ortega-Saenz, P., Duran, R., Platero-Luengo, A., and Lopez-Barneo, J. (2010). The carotid body, a neurogenic niche in the adult peripheral nervous system. *Arch Ital Biol* 148, 95-105.

Pastrana, E., Cheng, L.C., and Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6387-6392.

Pastrana, E., Silva-Vargas, V., and Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 486-498.

Pearse, A.G., Polak, J.M., Rost, F.W., Fontaine, J., Le Lievre, C., and Le Douarin, N. (1973). Demonstration of the neural crest origin of type I (APUD) cells in the avian carotid body, using a cytochemical marker system. *Histochemie Histochemistry Histochemie* 34, 191-203.

Peers, C., and Buckler, K.J. (1995). Transduction of chemostimuli by the type I carotid body cell. *J Membr Biol* 144, 1-9.

Peers, C., and Green, F.K. (1991). Inhibition of Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents by intracellular acidosis in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. *J Physiol* 437, 589-602.

Pistollato, F., Chen, H.L., Schwartz, P.H., Basso, G., and Panchision, D.M. (2007). Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 35, 424-435.

Platero-Luengo, A., Gonzalez-Granero, S., Duran, R., Diaz-Castro, B., Piruat, J.I., Garcia-Verdugo, J.M., Pardal, R., and Lopez-Barneo, J. (2014). An O<sub>2</sub>-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia. *Cell* 156, 291-303.

Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-1020.

Powell, F.L., Milsom, W.K., and Mitchell, G.S. (1998). Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* 112, 123-134.

Qin, H., Qu, C., Yamaza, T., Yang, R., Lin, X., Duan, X.Y., Akiyama, K., Liu, Y., Zhang, Q., Chen, C., *et al.* (2013). Ossifying fibroma tumor stem cells are maintained by epigenetic regulation of a TSP1/TGF-beta/SMAD3 autocrine loop. *Cell Stem Cell* 13, 577-589.

Ramirez-Castillejo, C., Sanchez-Sanchez, F., Andreu-Agullo, C., Ferron, S.R., Aroca-Aguilar, J.D., Sanchez, P., Mira, H., Escribano, J., and Farinas, I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9, 331-339.

Ramon y Cajal, S. (1928). Degeneration and Regeneration of the Nervous System. Oxford University Press, American Branch vol. 1; vol. 2.

- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111.
- Reynolds, B.A., and Rietze, R.L. (2005). Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat Methods* **2**, 333-336.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-1710.
- Reynolds, E.E., Mok, L.L., and Kurokawa, S. (1989). Phorbol ester dissociates endothelin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **160**, 868-873.
- Saldana-Caboverde, A., and Kos, L. (2010). Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**, 160-170.
- Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.M., *et al.* (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* **478**, 382-386.
- Santilli, G., Lamorte, G., Carlessi, L., Ferrari, D., Rota Nodari, L., Binda, E., Delia, D., Vescovi, A.L., and De Filippis, L. (2010). Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One* **5**, e8575.
- Scadden, D.T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**, 1075-1079.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7-25.
- Schwindt, T.T., Motta, F.L., Gabriela, F.B., Cristina, G.M., Guimaraes, A.O., Calcagnotto, M.E., Pesquero, J.B., and Mello, L.E. (2009). Effects of FGF-2 and EGF removal on the differentiation of mouse neural precursor cells. *An Acad Bras Cienc* **81**, 443-452.
- Semenza, G.L. (1999). Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 551-578.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* **21**, 7153-7160.
- Seri, B., Herrera, D.G., Gritti, A., Ferron, S., Collado, L., Vescovi, A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex* **16 Suppl 1**, i103-111.
- Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* **3**, 289-300.

Shin, M.K., Levorse, J.M., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1999). The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* 402, 496-501.

Shingo, T., Sorokan, S.T., Shimazaki, T., and Weiss, S. (2001). Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 21, 9733-9743.

Shooter, R.A., and Gey, G.O. (1952). Studies of the mineral requirements of mammalian cells. *Br J Exp Pathol* 33, 98-103.

Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., and Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372-376.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-845.

Simon, M.C., and Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 285-296.

Simonson, M.S., and Dunn, M.J. (1991). Endothelins: a family of regulatory peptides. State-of-the-art lecture. *Hypertension* 17, 856-863.

Smith, P., Gosney, J., Heath, D., and Burnett, H. (1990). The occurrence and distribution of certain polypeptides within the human carotid body. *Cell Tissue Res* 261, 565-571.

Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M.A., Sun, G.J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z.J., Ge, S., Enikolopov, G., *et al.* (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489, 150-154.

Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., *et al.* (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219-1227.

Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.

Spinella, F., Rosano, L., Del Duca, M., Di Castro, V., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2010). Endothelin-1 inhibits prolyl hydroxylase domain 2 to activate hypoxia-inducible factor-1alpha in melanoma cells. *PLoS One* 5, e11241.

Stea, A., and Nurse, C.A. (1991). Whole-cell and perforated-patch recordings from O<sub>2</sub>-sensitive rat carotid body cells grown in short- and long-term culture. *Pflugers Arch* 418, 93-101.

Stemple, D.L., and Anderson, D.J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71, 973-985.

Storch, A., Paul, G., Csete, M., Boehm, B.O., Carvey, P.M., Kupsch, A., and Schwarz, J. (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol* 170, 317-325.

Studer, L., Csete, M., Lee, S.H., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B., and McKay, R. (2000). Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 20, 7377-7383.

Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 9, 298-310.

Takahashi, K., Ghatge, M.A., Jones, P.M., Murphy, J.K., Lam, H.C., O'Halloran, D.J., and Bloom, S.R. (1991). Endothelin in human brain and pituitary gland: comparison with rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 7, S101-103.

Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., and Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 279-288.

Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112-117.

Teppema, L.J., and Dahan, A. (2010). The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol Rev* 90, 675-754.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.

Timmers, H.J., Wieling, W., Karemaker, J.M., and Lenders, J.W. (2003). Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. *J Physiol* 553, 3-11.

Toledo-Aral, J.J., Mendez-Ferrer, S., Pardal, R., and Lopez-Barneo, J. (2002). Dopaminergic cells of the carotid body: physiological significance and possible therapeutic applications in Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 57, 847-853.

Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3, 778-784.

Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., *et al.* (2005). Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 170, 1135-1146.

Treiber, A., Schneider, R., Delahaye, S., and Clozel, M. (2004). Inhibition of organic anion transporting polypeptide-mediated hepatic uptake is the major determinant in the pharmacokinetic interaction between bosentan and cyclosporin A in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 1121-1129.

Trentin, A., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N.M., and Dupin, E. (2004). Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4495-4500.

Urena, J., Fernandez-Chacon, R., Benot, A.R., Alvarez de Toledo, G.A., and Lopez-Barneo, J. (1994). Hypoxia induces voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> entry and quantal

- dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10208-10211.
- Villadiego, J., Mendez-Ferrer, S., Valdes-Sanchez, T., Silos-Santiago, I., Farinas, I., Lopez-Barneo, J., and Toledo-Aral, J.J. (2005). Selective glial cell line-derived neurotrophic factor production in adult dopaminergic carotid body cells in situ and after intrastriatal transplantation. *J Neurosci* 25, 4091-4098.
- Voog, J., and Jones, D.L. (2010). Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell* 6, 103-115.
- Wagers, A.J. (2012). The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell* 10, 362-369.
- Waldo, K., Zdanowicz, M., Burch, J., Kumiski, D.H., Stadt, H.A., Godt, R.E., Creazzo, T.L., and Kirby, M.L. (1999). A novel role for cardiac neural crest in heart development. *J Clin Invest* 103, 1499-1507.
- Wang, B.L., Sun, W., Shi, Z.C., Lou, J.N., Zhang, N.F., Shi, S.H., Guo, W.S., Cheng, L.M., Ye, L.Y., Zhang, W.J., *et al.* (2008). Decreased proliferation of mesenchymal stem cells in corticosteroid-induced osteonecrosis of femoral head. *Orthopedics* 31, 444.
- Wang, D.D., Krueger, D.D., and Bordey, A. (2003). GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. *J Physiol* 550, 785-800.
- Wang, L.D., and Wagers, A.J. (2011). Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 643-655.
- Wang, Z.Y., and Bisgard, G.E. (2005). Postnatal growth of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 149, 181-190.
- Ward, D.S., Voter, W.A., and Karan, S. (2009). The role of the carotid bodies in the counter-regulatory response to hypoglycemia. *Adv Exp Med Biol* 648, 273-280.
- Warner, T.D., Schmidt, H.H., and Murad, F. (1992). Interactions of endothelins and EDRF in bovine native endothelial cells: selective effects of endothelin-3. *Am J Physiol* 262, H1600-1605.
- Wehrwein, E.A., Basu, R., Basu, A., Curry, T.B., Rizza, R.A., and Joyner, M.J. (2010). Hyperoxia blunts counterregulation during hypoglycaemia in humans: possible role for the carotid bodies? *J Physiol* 588, 4593-4601.
- Weir, E.K., Lopez-Barneo, J., Buckler, K.J., and Archer, S.L. (2005). Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med* 353, 2042-2055.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., and Reynolds, B.A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16, 7599-7609.
- Weissman, I.L. (2000a). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.

Weissman, I.L. (2000b). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442-1446.

Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18, 779-791.

Winner, B., Desplats, P., Hagl, C., Klucken, J., Aigner, R., Ploetz, S., Laemke, J., Karl, A., Aigner, L., Masliah, E., *et al.* (2009). Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Exp Neurol* 219, 543-552.

Wouters, B.G., van den Beucken, T., Magagnin, M.G., Koritzinsky, M., Fels, D., and Koumenis, C. (2005). Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation. *Semin Cell Dev Biol* 16, 487-501.

Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernandez Acosta, P., Garcia-Verdugo, J.M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., Adachi, K., Kojima, T., Hirota, Y., Kawase, T., *et al.* (2006). Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26, 6627-6636.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415.

Yoshida, S., Shimmura, S., Nagoshi, N., Fukuda, K., Matsuzaki, Y., Okano, H., and Tsubota, K. (2006). Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 24, 2714-2722.

Zhang, M., Buttigieg, J., and Nurse, C.A. (2007). Neurotransmitter mechanisms mediating low-glucose signalling in cocultures and fresh tissue slices of rat carotid body. *J Physiol* 578, 735-750.

Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R.M., Johansson, C.B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J., and Janson, A.M. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7925-7930.

Zhao, Z., Taylor, W.D., Styner, M., Steffens, D.C., Krishnan, K.R., and MacFall, J.R. (2008). Hippocampus shape analysis and late-life depression. *PLoS One* 3, e1837.



# ANEXO

---

# An O<sub>2</sub>-Sensitive Glomus Cell-Stem Cell Synapse Induces Carotid Body Growth in Chronic Hypoxia

Aida Platero-Luengo,<sup>1</sup> Susana González-Granero,<sup>2,3</sup> Rocío Durán,<sup>1</sup> Blanca Díaz-Castro,<sup>1</sup> José I. Piruat,<sup>1</sup> José Manuel García-Verdugo,<sup>2,3</sup> Ricardo Pardal,<sup>1,\*</sup> and José López-Barneo<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, 41013 Seville, Spain

<sup>2</sup>Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, 46071 Valencia, Spain

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain

\*Correspondence: [rpardal@us.es](mailto:rpardal@us.es) (R.P.), [lbarneo@us.es](mailto:lbarneo@us.es) (J.L.-B.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.013>

## SUMMARY

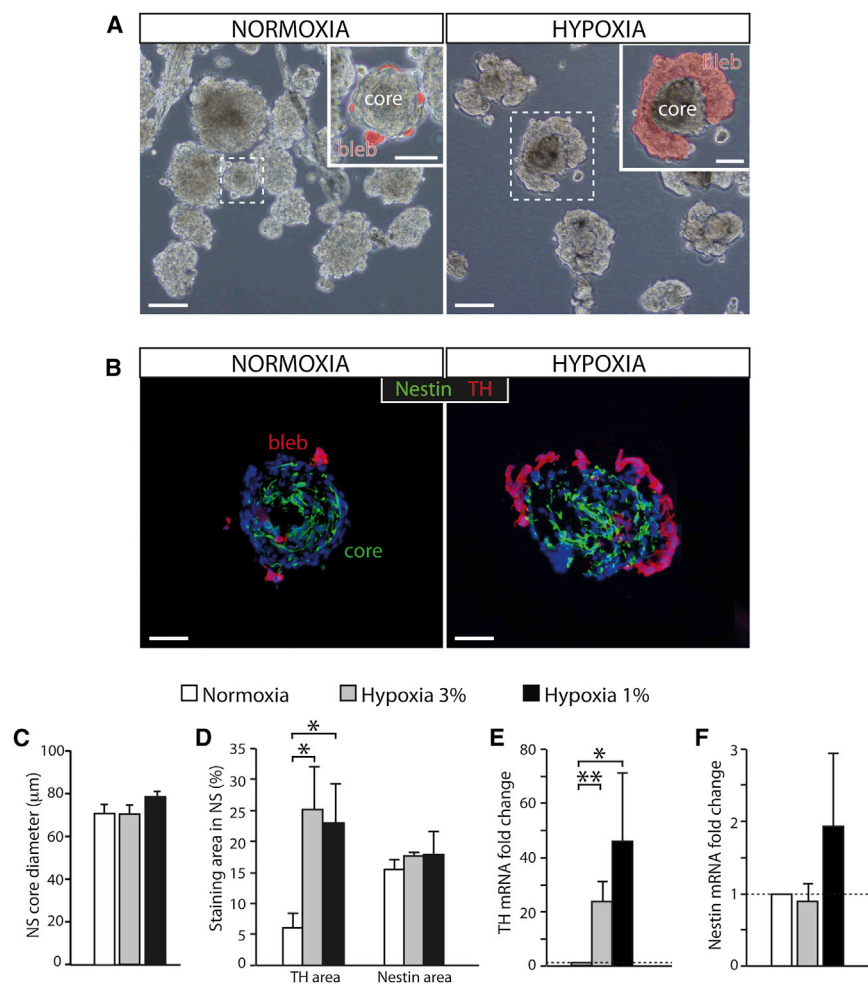
Neural stem cells (NSCs) exist in germinal centers of the adult brain and in the carotid body (CB), an oxygen-sensing organ that grows under chronic hypoxemia. How stem cell lineage differentiation into mature glomus cells is coupled with changes in physiological demand is poorly understood. Here, we show that hypoxia does not affect CB NSC proliferation directly. Rather, mature glomus cells expressing endothelin-1, the O<sub>2</sub>-sensing elements in the CB that secrete neurotransmitters in response to hypoxia, establish abundant synaptic-like contacts with stem cells, which express endothelin receptors, and instruct their growth. Inhibition of glomus cell transmitter release or their selective destruction markedly diminishes CB cell growth during hypoxia, showing that CB NSCs are under the direct “synaptic” control of the mature O<sub>2</sub>-sensitive cells. Thus, glomus cells not only acutely activate the respiratory center but also induce NSC-dependent CB hypertrophy necessary for acclimatization to chronic hypoxemia.

## INTRODUCTION

Adult stem cells reside within specific “niches” that provide the appropriate environment to maintain their ability for self-renewal and multipotency. These cells are normally in a dormant state that protects them from stressors; the manner by which they are selectively activated to progress from quiescence to differentiated mature cells is still to be resolved (Suda et al., 2011; Chell and Frisén, 2012). Neural stem cells (NSCs), which resemble embryonic radial glia-like cells and are able to generate new neurons and glial cells, persist in two niches in the adult mammalian central nervous system (CNS): the subventricular zone (SVZ) and the subgranular layer of the hippocampus (SGZ) (Álvarez-Buylla and Lim, 2004; Zhao et al., 2008). Central

neurogenesis is crucial for numerous brain functions, and its impairment could be involved in some neuropsychiatric disorders (Kriegstein and Álvarez-Buylla, 2009; Ming and Song, 2011). NSCs can sense neuronal activity as a result of which adult neurogenesis is modulated by experience and environmental stimuli. However, the coupling of lineage progression to physiological demand remains poorly understood. Several neurotransmitters modulate neurogenesis, one well-known example being the inhibition of SVZ cell proliferation in animals with dopaminergic nigrostriatal denervation (Höglinger et al., 2004). Transmitter “spill-over” from neighboring GABA-producing SVZ neuroblasts has been shown to provide an inhibitory feedback input for NSC proliferation (Liu et al., 2005; Ge et al., 2006). Moreover, glutamate (Deisseroth et al., 2004) and GABA (Tozuka et al., 2005) released from the hippocampal circuitry can modulate neural progenitors in the SGZ and induce neuronal differentiation. Recently, a mature granule cell to NSC connection, mediated by hippocampal GABAergic interneurons, was shown to couple neuronal activity to neurogenesis in the SGZ (Song et al., 2012).

Multipotent NSCs of glial lineage also exist in the adult carotid body (CB), a neural crest-derived paired organ located in the carotid bifurcation (Pardal et al., 2007). The CB is composed of clusters (glomeruli) of neuron-like glomus (type I) cells that are electrically excitable and have numerous secretory vesicles containing neurotransmitters and neuropeptides. Glomus cells are surrounded by processes of glia-like sustentacular (type II) cells. This organ is the main arterial chemoreceptor that mediates reflex hyperventilation during hypoxemia. Glomus cells, the primary O<sub>2</sub>-sensing elements in the CB, depolarize in response to hypoxia, thereby releasing neurotransmitters that activate sensory nerve fibers terminating in the brainstem respiratory center (see López-Barneo et al., 2001). In addition to this fundamental role in acute oxygen sensing, the CB exhibits a remarkable structural plasticity that is uncommon for a neural tissue, which is manifested upon chronic exposure to hypoxia. The CB grows to several times its normal size during acclimatization in high-altitude dwellers (Arias-Stella and Valcarcel, 1976) or in hypoxemic patients suffering cardiopulmonary disorders (Heath et al., 1982). We have shown that the glia-like type II cells, selectively



**Figure 1. Differential Effects of Hypoxia on CB NSC Proliferation and Differentiation**

(A) Bright-field images of CB primary neurospheres (NS) cultured under normoxia (Nx, 21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (Hx, 3% O<sub>2</sub>). Differentiating blebs are pseudocolored in red in the insets. Scale bars, 100 μm (50 μm in insets).

(B) CB NS composed of a core of nestin+ progenitors and blebs of TH+ cells as revealed by immunofluorescence. Scale bars, 50 μm.

(C) Quantification of NS core diameter in cultures grown at different levels of hypoxia (six cultures for Nx and Hx 3% O<sub>2</sub> and 3 cultures for Hx 1% O<sub>2</sub>).

(D) Quantification of nestin+ or TH+ staining area in normoxic and hypoxic NS sections. Note that the TH+ area clearly increased under Hx, whereas the nestin+ area did not change (n = 4 independent cultures).

(E and F) qPCR results showing relative expression of TH and nestin in NS at different levels of O<sub>2</sub> tension. The expression of TH significantly increased under hypoxia, whereas nestin expression showed a nonsignificant variability (n = 7 cultures in Nx and Hx 3% O<sub>2</sub>; 4 cultures for Hx 1% O<sub>2</sub>). In (C)–(F), error bars are SEM. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01.

See also Table S1.

expressing glial fibrillary acidic protein (GFAP), are NSCs and contribute to CB growth in hypoxia. These cells form clonal colonies in vitro that are enriched in proliferating nestin-positive(+) progenitors that give rise to mature glomus cells and other neural crest cell lineages. Similarly, cell fate experiments in vivo have demonstrated that NSCs contribute to the generation of new glomus cells in animals exposed to sustained hypoxia (Pardal et al., 2007).

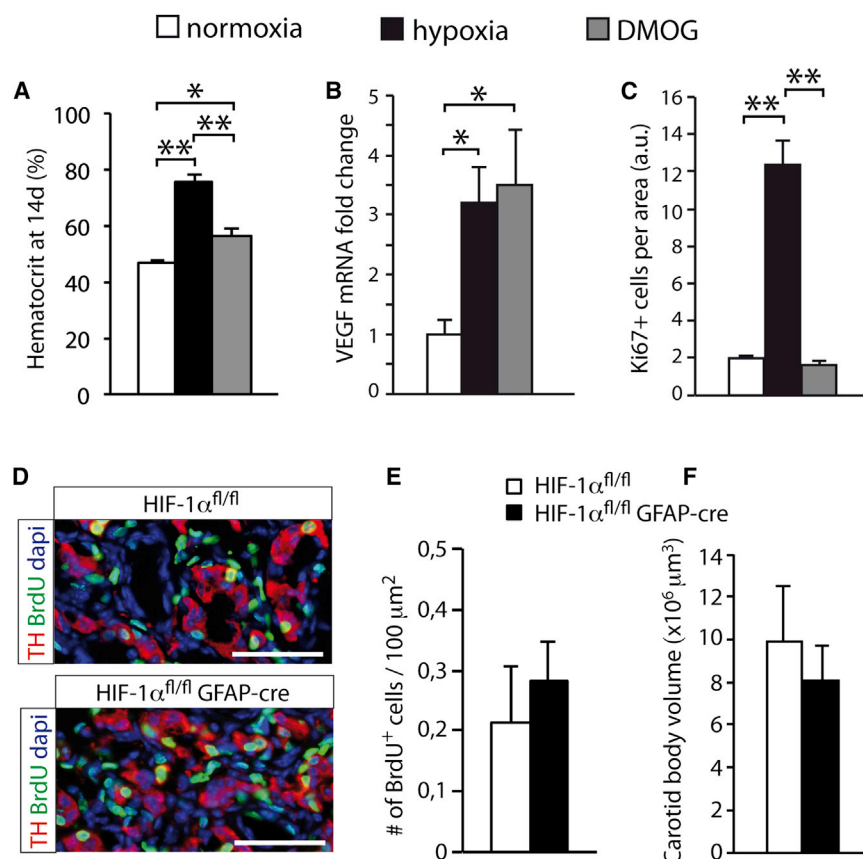
Stem cells in the CB neurogenic center are quiescent under normoxic conditions. Nonetheless, they become activated upon lowering blood O<sub>2</sub> tension (hypoxia), a well-defined and controllable variable. Therefore, the CB niche provides an ideal model in which to study activity-dependent neurogenesis and to explore the mechanisms whereby stem cells switch from dormancy to cycling. Herein, we show that, unexpectedly, CB NSC proliferation in vitro is insensitive to hypoxia over a broad range of O<sub>2</sub> tensions. We provide compelling structural and functional evidence supporting the existence of abundant direct “synaptic” contacts between mature neuron-like, O<sub>2</sub>-sensitive, glomus cells and glia-like progenitors, thus optimizing the activity-dependent stimulation of stem cells. The release of stored neurotransmitters from glomus cells during hypoxia

induces proliferation of progenitor cells and growth of the CB. Among the substances released by glomus cells, we have identified endothelin-1 (ET-1), an agent involved in neural crest progenitor specification and migration (Shin et al., 1999; Bonano et al., 2008), as a powerful activator of CB stem cell proliferation in vitro and in vivo. In this way, O<sub>2</sub>-sensing glomus cells mediate both the acute activation of the respiratory center and the chronic induction of CB growth upon exposure to hypoxia.

## RESULTS

### Contrasting Effects of Hypoxia on CB Stem Cell Proliferation and Dopaminergic Differentiation

CB stem cells cultured in floating conditions generate neurospheres composed of an initial cell mass (core) containing numerous proliferating nestin+ intermediate neural progenitors. The neurosphere core grows in size with time in culture, thereby providing an estimation of progenitor proliferation. After several days, the core is surrounded by peripheral blebs of differentiated dopaminergic, tyrosine hydroxylase (TH)-positive(+) glomus cells (Pardal et al., 2007) (Figures 1A and 1B). As hypoxia is the signal that triggers CB growth, we tested whether lowering the O<sub>2</sub> tension increased the proliferation of CB progenitors (Kokovay and Temple, 2007). Somewhat surprisingly, decreasing O<sub>2</sub> tension (in the range between 21% and 1%) did not alter the diameter of the neurosphere core measured 10 days after plating (Figures 1A–1C). This finding was confirmed by estimating the



**Figure 2. HIF Stabilization Does Not Induce CB Growth**

(A) Quantification of the hematocrit in rats exposed to hypoxia (10%  $\text{O}_2$ ) or maintained in a normal atmosphere and treated with DMOG for 14 days, in comparison with normoxic rats. Note that inhibition of prolyl hydroxylases with DMOG increased the hematocrit, although to a lesser extent than hypoxia.

(B) Quantitative PCR showing the overexpression of VEGF, an HIF-dependent gene, in the brain of rats exposed to Nx, Hx, or treated with DMOG.

(C) Quantification of the density of Ki67+ cells within the CB parenchyma of rats exposed to Nx (21%  $\text{O}_2$ ), Hx (10%  $\text{O}_2$ ), or DMOG (21%  $\text{O}_2$ ) for 3 days. DMOG did not increase cell proliferation in the CB despite inducing HIF-dependent genes (three rats per group). In (A)–(C), error bars represent SEM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

(D) Immunohistochemistry of BrdU and TH in CBs of HIF-1 $\alpha^{\text{fl/fl}}$  GFAP-cre and WT mice exposed to Hx 10%  $\text{O}_2$  for 19 days. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ .

(E and F) BrdU+ cell number (E) and CB volume (F) in HIF-1 $\alpha^{\text{fl/fl}}$  GFAP-cre and WT mice exposed to chronic Hx (five CBs from three mutant mice and three CBs from two WT mice). In (E) and (F), error bars represent SEM.

See also Table S1.

area of nestin+ cells (Figure 1D) or the level of nestin mRNA (Figure 1F) in the neurospheres. In contrast, the size of the TH+ blebs (Figures 1A, 1B, and 1D) and TH mRNA level (Figure 1E) markedly increased during exposure to hypoxia. These results indicate that proliferation of CB NSCs is not directly regulated by hypoxia, even when these cells are exposed to  $\text{O}_2$  tensions as low as 1%  $\text{O}_2$ , a level far below that necessary to evoke acute secretory responses in glomus cells (Ortega-Sáenz et al., 2010). As in other cell types (Czyzyk-Krzeska et al., 1992), hypoxia upregulated TH mRNA and favored dopaminergic differentiation of CB NSCs, similar to what has been described in sympathoadrenal progenitors (Morrison et al., 2000).

### Systemic Inhibition of Prolyl Hydroxylases Does Not Induce Proliferation of CB Cells

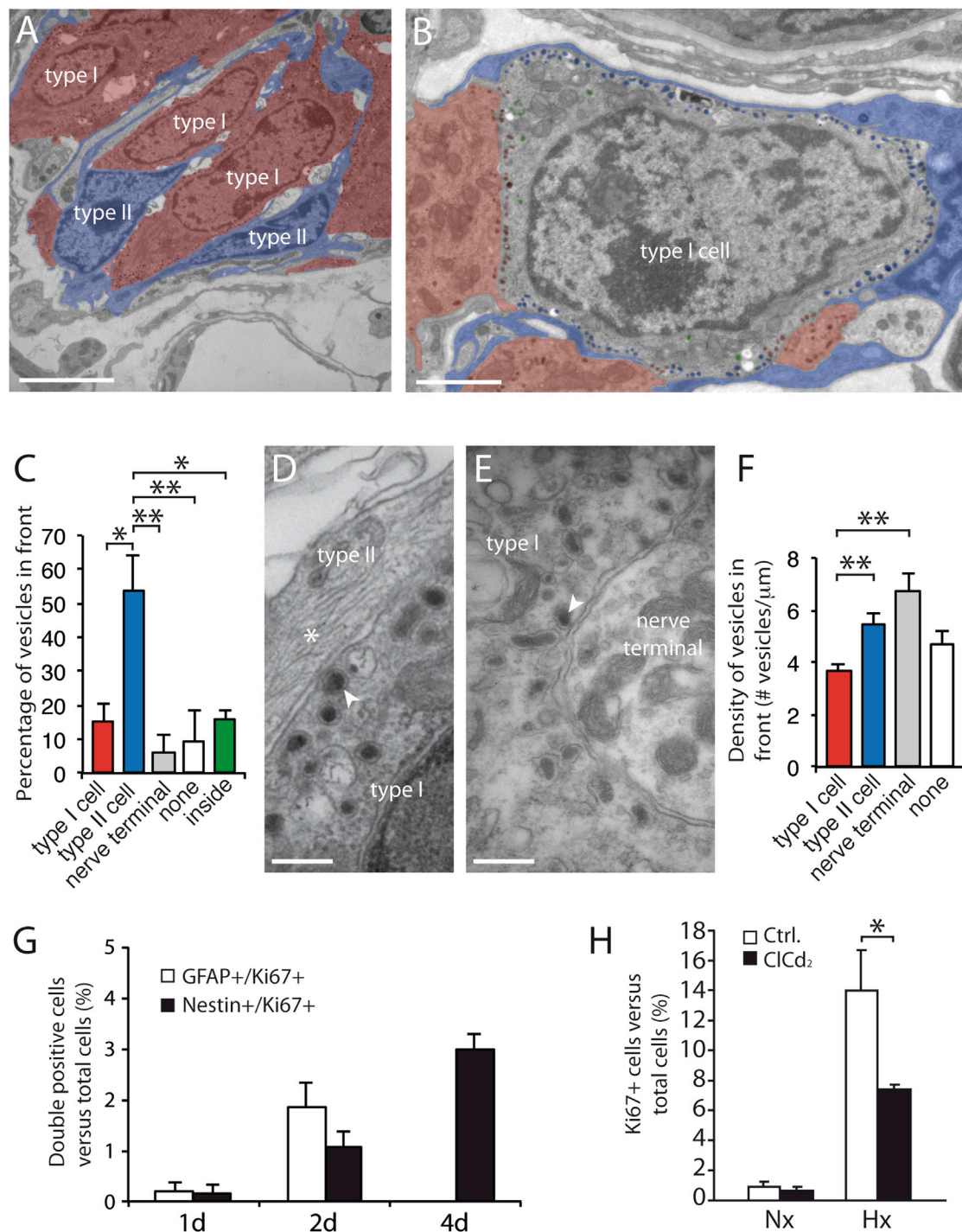
In parallel with the *in vitro* experiments, we also tested whether mimicking hypoxia by inhibition of prolyl hydroxylases (PHDs) with dimethylxallylglycine (DMOG) induced CB NSC proliferation *in vivo*. PHDs are  $\text{O}_2$ -sensitive enzymes whose inhibition by the lack of  $\text{O}_2$  permits stabilization of hypoxia-inducible factors (HIFs), which in turn regulate the expression of a broad variety of  $\text{O}_2$ -sensitive genes, some of which are involved in cell proliferation (Kaelin and Ratcliffe, 2008). Similar to chronic hypoxia, application of DMOG for several days resulted in the induction of HIF-dependent genes such as those for erythropoietin to increase the hematocrit (Figure 2A) and brain vascular endothelial

growth factor (VEGF; Figure 2B). However, in contrast with hypoxia, DMOG treatment was unable to produce an appreciable proliferation of CB cells (Figure 2C). Hypoxic CB cell proliferation and organ growth were also normal in animals with ablation of HIF-1 $\alpha$  in GFAP-positive cells (Figures 2D–2F). These data suggest that neither activation of the HIF pathway nor HIF-1 $\alpha$  inhibition is the primary signal that triggers cell proliferation and CB growth in hypoxic conditions.

### Structure of Glomus Cell-Type II Cell “Synapses”

We hypothesized that hypoxia-dependent CB progenitor proliferation *in situ* could take place secondarily to the activation of mature glomus cells, which show hypoxia-evoked quantal transmitter release that is unaffected by DMOG but is exquisitely dependent on the level of  $\text{O}_2$  tension (Ortega-Sáenz et al., 2007; Ortega-Sáenz et al., 2010). This idea fits well with the close structural relationship that exists between TH+ type I cells and GFAP+ type II cells, which are quiescent progenitor cells (Pardal et al., 2007). Indeed, as reported in numerous electron microscope (EM) studies, large surface areas of type I cells are actually enveloped by the processes of type II cells (Figure 3A). Here, we performed EM analyses to study these type I-type II cell contacts and found that the two cell types were clearly distinguishable in ultrathin sections. In this way, glomus cells have a large cytoplasmic domain containing abundant mitochondria, long endoplasmic reticulum cisternae, and, in particular, numerous secretory vesicles (Figures 3A and 3B). It is known that glomus cells function as presynaptic-like elements, which, in response to hypoxia, acutely release vesicle-stored neurotransmitters in





**Figure 3. Synaptic-like Contacts between Neuron-like Type I and Glia-like Type II Cells within the CB Parenchyma**

(A) Pseudocolored electron micrograph of a CB ultrathin section of a normoxic animal showing the close association of type II progenitor cells with type I neuronal cells. Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ .

(B) Pseudocolored electron micrograph illustrating the cellular elements surrounding a typical type I cell within the CB parenchyma. Type II cells and the type I vesicles facing them appear in blue; type I cells and the vesicles facing them appear in red; vesicles away from the membrane (inside in C) appear in green. Scale bar, 2  $\mu\text{m}$ .

(C) Quantification of the percentage of type I dense-core vesicles facing each of the different cellular elements surrounding a typical type I cell.

(D and E) Electron micrographs of a CB showing details of the contact area between type II and type I cells (D) or between a type I and a nerve terminal (E). Examples of exocytotic vesicles apposed near the membrane are indicated with arrowheads. A bundle of intermediate filaments, characteristic of type II cells, is indicated by an asterisk in (D). Scale bars, 0.2  $\mu\text{m}$ .

(legend continued on next page)

an external  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner, thereby activating afferent chemosensory fibers (Ureña et al., 1994; Buttigieg and Nurse, 2004). However, an intriguing property of glomus cells is that their secretory vesicles do not seem to be clustered facing nerve terminals but are more uniformly distributed over the entire glomus cell surface (Figure 3B). Indeed, a quantitative analysis of the number of vesicles located in front of the various cell membranes surrounding glomus cells showed that the vast majority of vesicles lay near type II cells (Figure 3C). Even the density of secretory granules in the different glomus cell “presynaptic” regions was the same when the “postsynaptic” membrane was either a nerve terminal or a type II cell (Figures 3D–3F). Often, the glomus cell membrane (with submembranous localization of dense-core vesicles) was separated from a type II cell by <50 nm (Figure 3D), which is similar to the space in glomus cell-nerve terminal synapses (Figure 3E). “Synaptic” contacts between neighboring type I cells were also frequently observed (Figures 3B and 3C). Therefore, it is likely that the transmitters released from “presynaptic” glomus cells in response to hypoxia not only activate the afferent sensory fibers but could also bind to receptors and modify the function of “postsynaptic” type II and/or type I cells. These observations strongly suggest that  $\text{O}_2$ -sensing glomus cells are essential for triggering the proliferation of CB progenitor cells in hypoxia.

### CB Growth in Hypoxia Requires Activation of Glomus Cells

The time course of CB cell proliferation induced by hypoxia *in vivo* is illustrated in Figures 3G and 3H. Animals were maintained in a 10%  $\text{O}_2$  atmosphere for variable time periods and, after CB removal, proliferating cells were identified based on their expression of Ki67. Within this population, we also identified cells coexpressing selective markers: type II cells (GFAP+), intermediate progenitors (nestin+), type I cells (TH+), and endothelial cells (lectin+) (Figure S1A available online). The number of proliferating progenitor (GFAP+ or nestin+) cells increased during the days following exposure to hypoxia. Proliferation of lectin+ endothelial cells was only observed at later stages of hypoxia (data not shown). Initially, numerous cells were GFAP+ (indicating proliferation of stem cells) but, as previously reported (Pardal et al., 2007), this phenotype disappeared a few days after exposure to hypoxia in parallel with the appearance of nestin+ intermediate progenitors (Figure 3G). In addition to the CB progenitors, the Ki67 marker also labeled a significant number of proliferating TH+ cells (see Discussion). Glomus cells respond to hypoxia with a rise in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and a quantal release of transmitters that is inhibited *in vitro* by blockade of  $\text{Ca}^{2+}$  channels with  $\text{Cd}^{2+}$  and other divalent cations (Ureña et al., 1994; Buttigieg and Nurse, 2004). In line with this observation, systemic administration of subtoxic doses of  $\text{Cd}^{2+}$  (Stosic et al., 2010) to

animals exposed to hypoxia resulted in a marked reduction in the number of Ki67+ CB cells (Figure 3H). Other highly proliferative tissues, such as the gut epithelium, remained unaffected by the systemic administration of  $\text{Cd}^{2+}$ , thus ruling out the possibility of a toxic effect (data not shown).

Further support for the essential role played by glomus cells in triggering CB growth in hypoxia was obtained from experiments performed on TH-SDHD mice. These animals lack the “D” subunit of mitochondrial complex II in TH+ cells and show a marked loss of catecholaminergic cells in the CB and other tissues (Díaz-Castro et al., 2012). A detailed EM analysis of the CB from TH-SDHD mice indicated marked disruption of the CB glomeruli (Figures 4A and 4B), with type I (glomus) cells in different stages of degeneration displaying increased numbers of mitochondria (which were dilated and had disorganized cristae) and the appearance of numerous vacuoles (Figures 4C and 4D). The number of dense-core secretory vesicles, a typical feature of glomus cells (Figures 4C and 4E), was markedly reduced in the TH-SDHD mice (Figures 4D and 4F). As the gene mutation in this model is restricted to glomus cells, type II cells appeared normal, showing their typical ultrastructural characteristics: fusiform nucleus, large nucleolus, scarce perinuclear cytoplasm with few mitochondria, and the absence of secretory vesicles. They also displayed the characteristic long processes enveloping type I cells (Figures 4A, 4B, 4G, and 4H). Dissociated cells from CBs of the TH-SDHD mice were able to form neurospheres *in vitro*, further supporting the conclusion that the function of type II cells was unaltered in these animals. TH-SDHD mice are normal in normoxia but die within hours/days after exposure to 10%  $\text{O}_2$  tension, probably because the lack of a functional CB renders them unable to acclimatize to sustained hypoxia (see Discussion). However, these animals survived in 14%  $\text{O}_2$  tension for more than a week. The proliferation of CB progenitor cells, induced after 6 days in a 14%  $\text{O}_2$  atmosphere, was clearly reduced in TH-SDHD mice compared with wild-type (WT) animals (Figures 4I and 4J). Taken together, the experiments performed with  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers (that decrease transmitter release from  $\text{O}_2$ -sensitive glomus cells), as well as those carried out in CBs with damaged and vesicle-depleted glomus cells (TH-SDHD mice), strongly suggest that activation of glomus cells is the initial step inducing CB growth upon exposure to hypoxia.

### Endothelin-1 Synthesized and Released by Glomus Cells Regulates Cell Proliferation and CB Growth

Among the various transmitters and neuropeptides existing in the CB, we focused our study on endothelin-1 (ET-1) because this peptide and endothelin receptor A (ET-RA) are abundant in glomus cells (McQueen et al., 1995; Paciga et al., 1999; Chen et al., 2002). Moreover, G-protein-coupled endothelin receptors

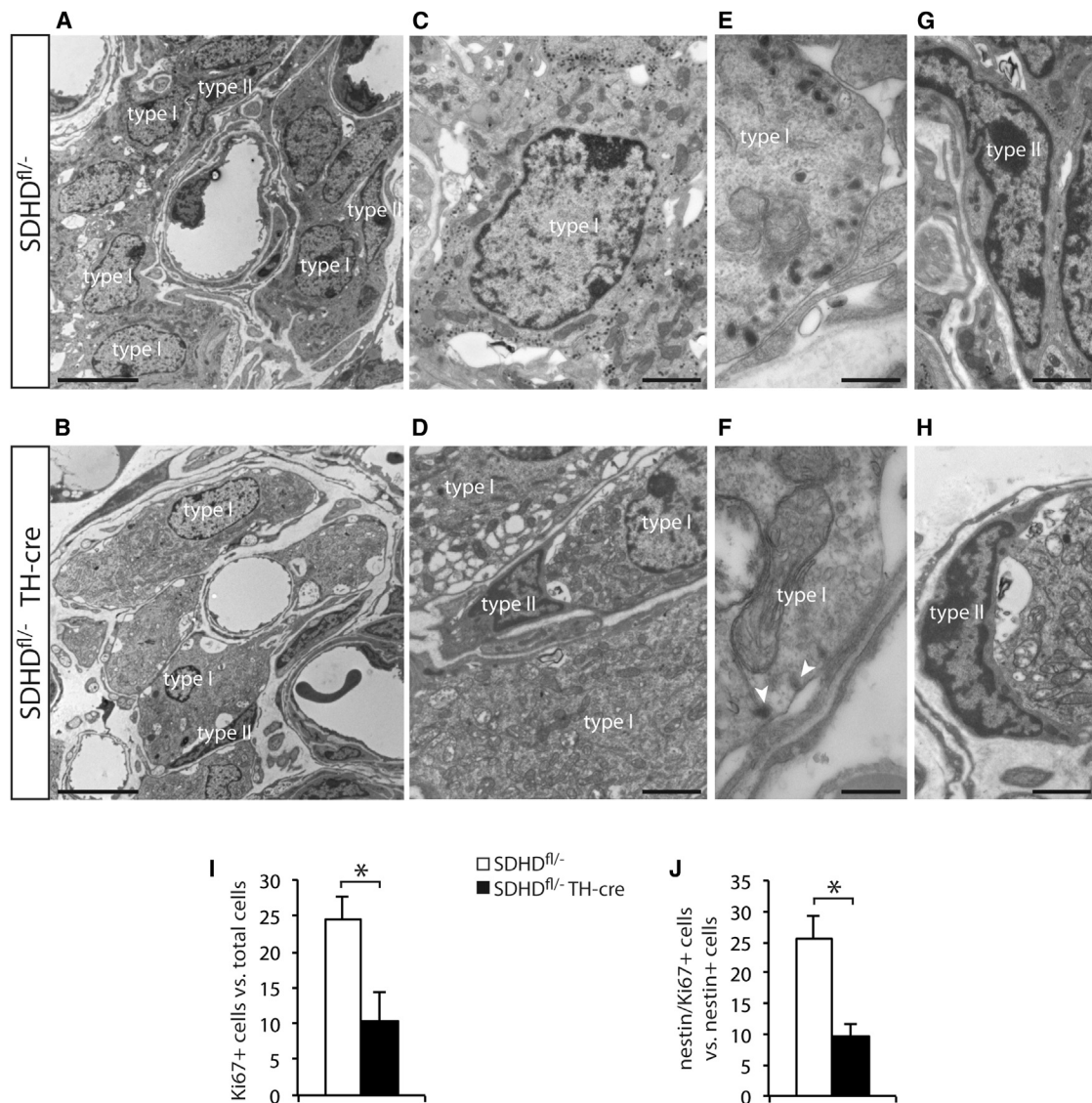
(F) Quantification of the density of type I dense-core vesicles per unit length of glomus cell membrane depending on the cellular element present in front. The density was significantly higher when a type II cell or a nerve terminal appeared as “postsynaptic” membrane; \*\* $p < 0.01$ .

(G) Quantification of proliferating CB progenitor cells after removal of the organ and dissociation of the cells during the initial days after exposure to hypoxia (three rats per group).

(H) Quantification of proliferative cells (Ki67+) among the total cell population from dissociated CBs of rats exposed to 2 days of Nx (six rats) or Hx (seven rats), with or without intraperitoneal injection of cadmium; \* $p < 0.05$ .

In (C), (F), (G), and (H), error bars represent SEM. See also Figure S1A.





**Figure 4. Genetic Disruption of Type I Cell Function Diminishes CB Proliferative Activation under Hypoxia**

(A) Electron micrograph showing the CB neural parenchyma of an SDHD<sup>fl/fl-</sup> (control) mouse to illustrate the normal appearance of type I and type II cells. Scale bar, 5  $\mu$ m.  
 (B) Electron micrograph showing the CB neural parenchyma of an SDHD<sup>fl/fl-</sup> TH-cre mutant mouse to illustrate the abnormal appearance of type I cells with smaller nuclei and enlarged cytoplasm. Scale bar, 5  $\mu$ m.  
 (C) Detail of a type I cell in the CB of a control mouse containing numerous dense-core vesicles. Scale bar, 2  $\mu$ m.  
 (D) Detail of CB type I cells in a mutant mouse. Cells show an increased number of mitochondria and almost no dense-core vesicles. The type I cell at the top left also has numerous vacuoles. Scale bar, 2  $\mu$ m.  
 (E) Detail of dense-core vesicles within the cytoplasm of a type I cell in the CB of a control mouse. Scale bar, 0.5  $\mu$ m.  
 (F) Detail of the cytoplasm of a type I cell in the CB of an SDHD<sup>fl/fl-</sup> TH-cre mouse, in which mitochondrial dysfunction resulted in a marked decrease in the number of secretory vesicles. Arrowheads indicate two vesicles present in this field. Scale bar, 0.5  $\mu$ m.  
 (G) Detail of a typical type II cell in the CB neural parenchyma of a control mouse. Scale bar, 2  $\mu$ m.  
 (H) Normal disposition and appearance of a type II cell surrounding a type I cell in the CB neural parenchyma of an SDHD<sup>fl/fl-</sup> TH-cre mouse. Scale bar, 2  $\mu$ m.  
 (I and J) Quantification of Ki67+ (I) or nestin/Ki67 double-positive (J) cells versus total dissociated cells from the CBs of SDHD<sup>fl/fl-</sup> (n = 4) or SDHD<sup>fl/fl-</sup> TH-cre (n = 3) mice exposed to Hx 14% O<sub>2</sub> for 6 days.  
 Error bars represent SEM. \*p < 0.05.

(A and B) mediate cell proliferation in several tissues (Koyama and Michinaga, 2012) and are required for the correct specification (Bonano et al., 2008) and migration (Shin et al., 1999) of neu-

ral crest progenitors. The CB is profusely irrigated, and as a result, unequivocal identification of ET-1 in glomus cells is hampered by the presence of abundant endothelial cells that

highly express ET-1 (see [Rubanyi and Polokoff, 1994](#) and [Figures S1B and S1C](#)). Indeed, a large percentage of cells dissociated from the CB were sorted with the specific endothelial cell marker CD31 ([Figure 5A](#)). As expected, this TH<sup>−</sup> and cadherin-5<sup>+</sup> (another endothelial cell marker) population contained a significant amount of ET-1 mRNA ([Figure 5B](#)). However, ET-1 mRNA was also highly expressed in the CD31<sup>−</sup> population, which includes TH<sup>+</sup> glomus cells ([Figure 5B](#)). As in other tissues ([Elton et al., 1992](#)), ET-1 mRNA was upregulated by hypoxia in dissociated CB cells maintained in vitro ([Figure 5C](#)). The CD31<sup>+</sup> population completely disappeared in CB-derived neurospheres ([Figures 5D and 5E](#)). However, these preparations expressed high levels of ET-1 mRNA, which was also markedly induced by hypoxia ([Figure 5F](#)). ET-1 expression was particularly high in differentiated neurospheres, enriched in TH<sup>+</sup> cells (insets in [Figures 5D–5F and S2](#)). Definitive support for the localization of ET-1 in glomus cells was obtained from experiments performed on TH-EGFP mice, which allowed us to sort a pure population of ET-1-expressing glomus cells ([Figures 5G and 5H](#)).

There are two main types of endothelin receptor: ET-RA and ET-RB ([Hosoda et al., 1994](#); [Clouthier et al., 1998](#)). We detected abundant ET-RA and ET-RB mRNAs in both CB tissue and CB-derived neurospheres ([Figure 6A](#)). The presence of ET-RA and ET-RB in TH<sup>+</sup> glomus cells, as well as in TH<sup>−</sup> type II cells, was also evidenced by immunohistochemistry ([Figures 6B and 6C](#)). ET-RA was more abundantly expressed in the CB (~40% of the cells) than ET-RB (~20% of the cells). However, whereas ET-RB was highly expressed in all GFAP<sup>+</sup> or nestin<sup>+</sup> cells (see [Figures 6D and 6E](#)), ET-RA was only weakly expressed in ~40% and 7% of GFAP<sup>+</sup> or nestin<sup>+</sup> cells, respectively. In contrast, ET-RA appeared in all TH<sup>+</sup> cells. Interestingly, <3% of TH<sup>+</sup> cells expressed ET-RB, and the quantitative analysis of ET-RB mRNA expression clearly showed that it is far more abundant in undifferentiated than in differentiated neurospheres ([Figure 6F](#)). These observations indicate that, whereas ET-1 synthesis is induced in glomus cells during hypoxia, endothelin receptors (particularly ET-RB) are highly expressed in stem cells and proliferating CB progenitor cells, thereby suggesting an ET-1-mediated communication between mature glomus cells and stem cells. In line with this concept and previous reports ([Chen et al., 2007](#)), bosentan, a nonselective endothelin receptor antagonist used as an antiproliferative drug, inhibited CB cell proliferation during exposure to hypoxia ([Figures 6G and S3](#)).

The effect of ET-1 on CB cell proliferation was directly demonstrated in vitro ([Figure 7A](#)). ET-1 added to CB cell cultures increased neurosphere-forming efficiency ([Figure 7B](#)), neurosphere core diameter, and the number of nestin<sup>+</sup> cells ([Figures 7C and 7D](#)) in a dose-dependent manner ([Figure 7E](#)). As observed in vivo, CB progenitor proliferation induced by ET-1 was inhibited by the presence of an endothelin receptor antagonist ([Figure 7F](#)). In parallel with the increase in progenitor proliferation, there was an ET-1-mediated decline in differentiation to TH<sup>+</sup> glomus cells ([Figure S4](#)). The pharmacological effects of ET-1 and endothelin receptor blockade were further confirmed by experiments in which receptor expression was selectively downregulated by specific siRNAs ([Figures S5A and S5B](#)). This did not interfere with the neurosphere growth but reduced by

almost 50% the stimulatory effect of ET-1 on neurosphere core diameter ([Figures 7G and S5C](#)). Binding of ET-1 to its receptors leads to activation of the MAP kinase signaling pathway with induction of *c-myc* and other proproliferative and antiapoptotic genes ([Wang et al., 1994](#); [Shichiri et al., 1998](#)). This characteristic response to ET-1 was also observed in CB neurosphere cultures ([Figure 7H](#)). ET-1 increased the expression of the Ki67 proliferation marker in nestin<sup>+</sup> progenitor cells ([Figure S6](#)), confirming a direct induction of CB NSC proliferation.

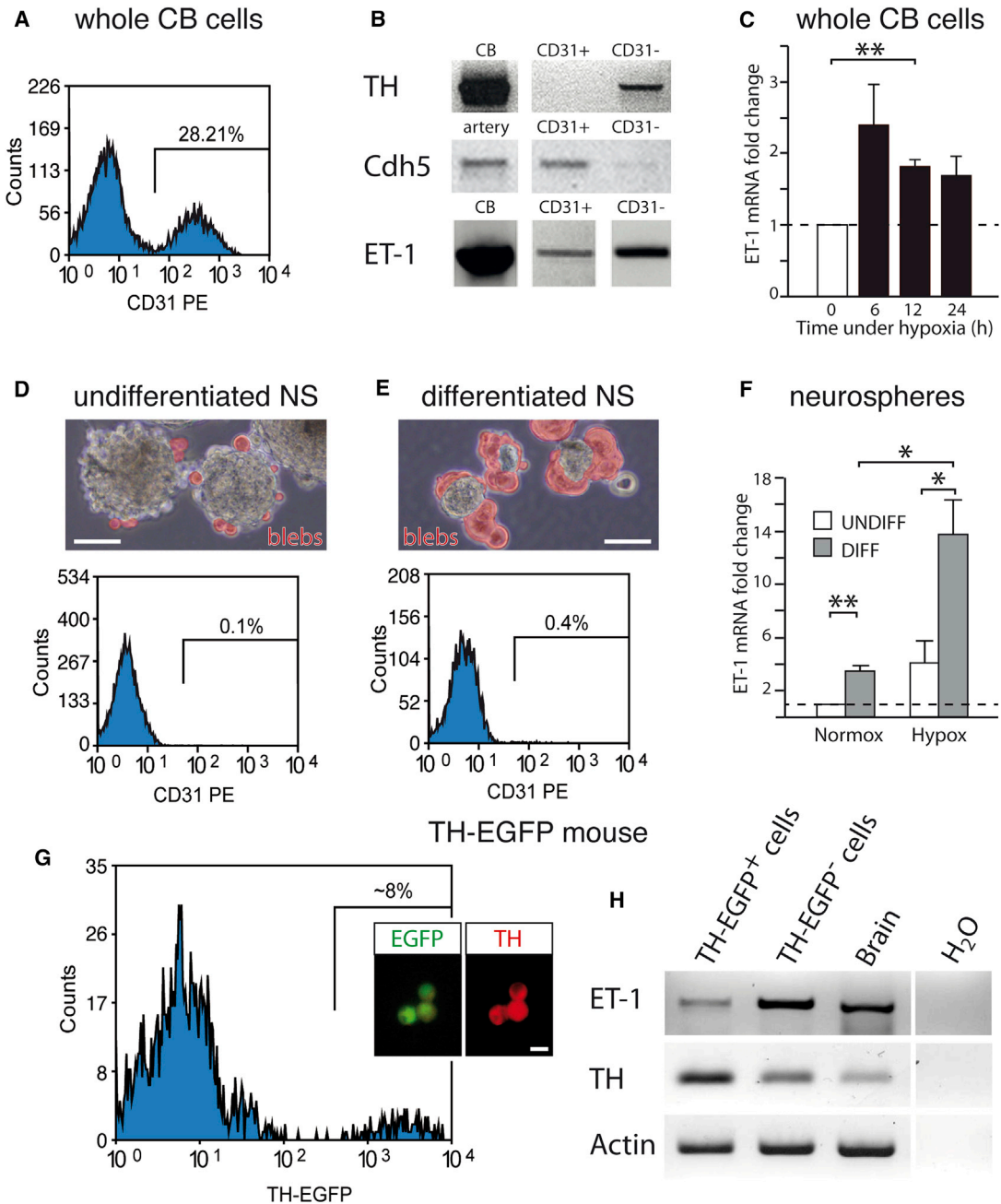
## DISCUSSION

### CB Neural Stem Cell Activation Is Not Directly Regulated by Hypoxia

O<sub>2</sub> tension has been recognized as an important variable that regulates self-renewal, proliferation, and differentiation of stem cells ([Panchision, 2009](#); [Mohyeldin et al., 2010](#)). Most adult stem cell niches have a relatively low O<sub>2</sub> tension that helps to maintain the cells in a dormant state with predominantly anaerobic metabolism, preserving them from excessive production of reactive oxygen species and other stressors ([Suda et al., 2011](#)). In normoxia, CB stem cells also appear to be quiescent ([Pardal et al., 2007](#)). Nonetheless, we expected that hypoxia could directly modulate the proliferative status of the stem cells to induce growth of the organ. Stabilization of HIF has been reported to induce proliferation in several cell types ([Kaelin and Ratcliffe, 2008](#)), including hippocampal NSCs ([Panchision, 2009](#); [Suda et al., 2011](#)). Somewhat surprisingly, chronic exposure of CB stem cells in vitro to hypoxia did not affect proliferation of progenitors in the neurospheres. These findings were in fair agreement with in vivo experiments showing that inhibition of O<sub>2</sub>-sensitive PHDs with DMOG did not evoke CB growth or progenitor proliferation. Similar results in vivo have been obtained independently using a different PHD inhibitor ([Bishop et al., 2013](#)). Our data indicate that HIF activation or HIF-1 $\alpha$  inhibition are not the primary signals that trigger the transition of CB NSCs from quiescence (in normoxia) to proliferation (in hypoxia). They also suggest that physiological activation of CB progenitors by hypoxia is a niche property rather than an intrinsic characteristic of the stem cells.

### Oxygen-Dependent Activation of the CB Niche Is Mediated by Direct Neuronal-Stem Cell Chemical Synapses

A fundamental question under intense scrutiny is how stem cells in the niches progress from quiescence to proliferation, allowing them to respond to the dynamic needs of tissues (see [Chell and Frisén, 2012](#)). Puzzled by the finding that CB NSC proliferation is unaffected by hypoxia, we hypothesized that mature glomus cells, acting as acutely responding O<sub>2</sub> sensors (see [López-Barneo et al., 2001](#)), could induce type II cell activation during exposure to low PO<sub>2</sub>. We have found compelling structural evidence indicating that most of the secretory vesicles in glomus cells are actually located facing type II cells. Glomus and type II cells are frequently separated by a “synaptic space” (<50 nm) similar to that existing between glomus cells and nerve terminals. Therefore, as well as the effect on the chemosensory synapse activating the respiratory center, neurotransmitter release from



**Figure 5. ET-1 Expression in CB Glomus Cells In Vivo and In Vitro**

(A) Flow cytometry histogram of dissociated whole CB cells stained with CD31.

(B) Nonquantitative PCR showing the expression of TH, cadherin 5 (Cdh5), and ET-1 in different cell populations sorted from dissociated CB preparations by flow cytometry.

(C) Quantitative PCR data illustrating the induction of ET-1 expression in CB cells exposed to chronic hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for the indicated periods (n = 5 cultures).

(D and E) Top, bright-field pictures of undifferentiated and differentiated NS, with differentiated blebs pseudocolored in red. Bottom, flow cytometry histograms showing the absence of CD31+ endothelial cells in both types of NS. Scale bars, 50  $\mu$ m.

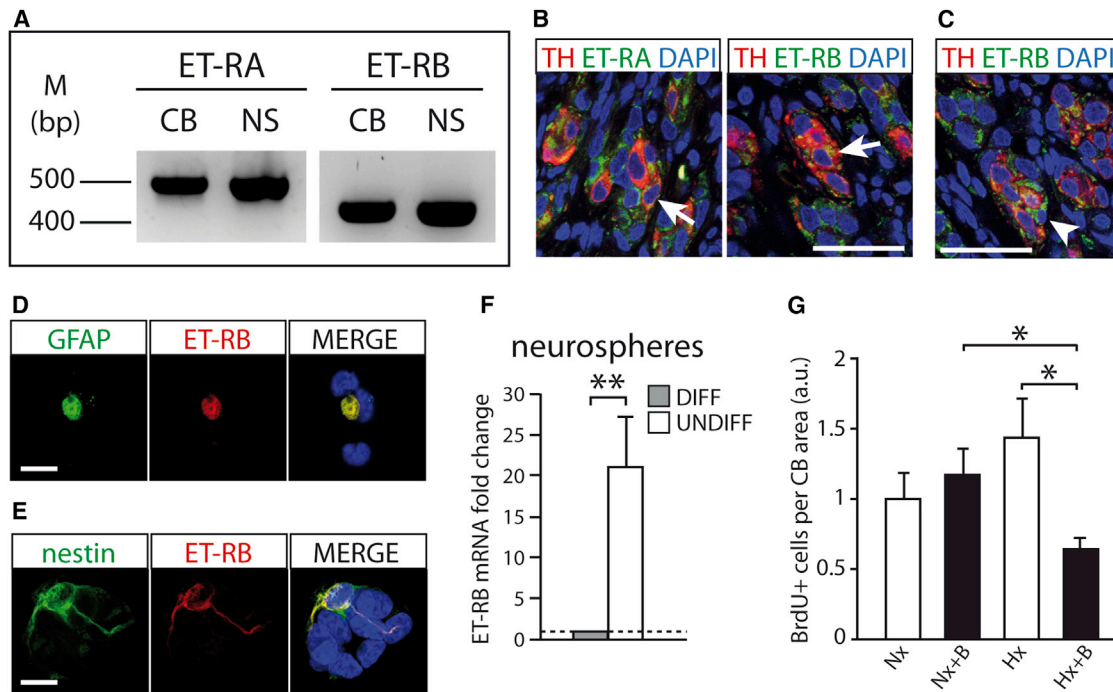
(F) Quantitative PCR showing the higher expression of ET-1 in differentiated (enriched for TH<sup>+</sup> cells) in comparison with undifferentiated NS after 2 days in normoxic or hypoxic (1% O<sub>2</sub>) culture conditions (n = 3 different cultures per condition). In (C) and (F), error bars represent SEM. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01.

(G) Flow cytometry histogram of dissociated CB cells from TH-EGFP mice. The inset shows immunocytochemistry results illustrating that all EGFP+ cells sorted were TH+ (over 100 cells checked). Scale bar, 10  $\mu$ m.

(H) PCR analysis showing ET-1 expression in sorted TH+ cells. PCR bands are shown separated from each other (B and H) when superfluous lanes have been removed from the gel.

See also Figures S1B, S1C, S2, and Table S1.





**Figure 6. ET-1 Receptor Expression in CB Parenchyma and Effects of ET-1 on CB Growth**

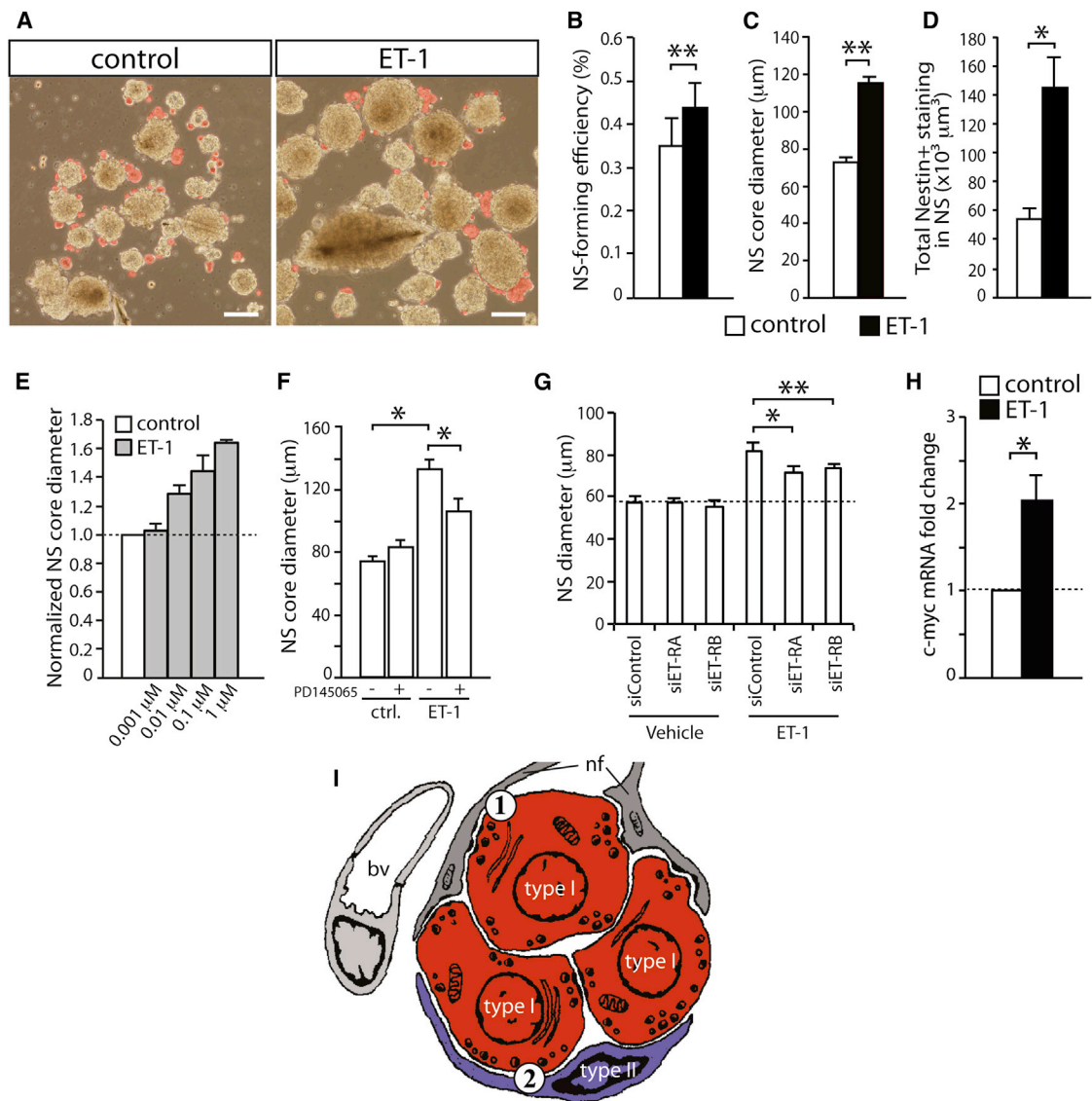
(A) Nonquantitative PCR revealing expression of endothelin receptors A and B in whole CB and NS.  
 (B and C) Confocal microscopy photographs of CB sections showing immunofluorescent detection of TH and endothelin receptors. Endothelin receptors A and B were both expressed in type I (arrows in B) and type II (arrowhead in C) cells. Scale bars, 50  $\mu$ m.  
 (D and E) Immunofluorescence detection of endothelin receptor B in GFAP+ or nestin+ cells dispersed from CBs. Scale bars, 10  $\mu$ m.  
 (F) Quantitative PCR showing a higher expression of endothelin receptor B in undifferentiated versus differentiated neurospheres ( $n = 3$  cultures).  
 (G) Quantification of BrdU+ cells within CB sections of animals exposed to normoxia (Nx) or hypoxia (Hx) and treated systemically with (+B) or without bosentan (five CBs per condition).  
 In (F) and (G), error bars represent SEM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ . See also Figures S2, S3, and Table S1.

glomus cells during exposure to hypoxia could also stimulate CB type II stem cells. This concept is fully supported by our *in vivo* functional experiments indicating that blockade of transmitter release with cadmium or selective genetic impairment of glomus cells results in a reduced responsiveness of the CB (activation of CB progenitor cells) to hypoxia.

The existence of synaptic-like contacts between mature glomus cells and stem cells in the CB is a structural specialization designed to optimize the general principle of the activity-dependent control of stem cell function, which appears to regulate the central neural niches. The neurogenic areas in the adult brain are innervated by projection fibers and are therefore affected by the release of several transmitters. However, the local circuitry can also control NSC function. In the SVZ, depolarization of neuroblasts induces nonsynaptic GABA<sub>A</sub> receptor currents in GFAP-positive progenitors that limit their progression through the cell cycle (Liu et al., 2005; Ge et al., 2006). Recently, it has been shown that the maintenance of stem cell quiescence in the dentate gyrus is modulated by a subset of parvalbumin-positive GABAergic interneurons, which are activated by mature granule cells (Song et al., 2012). A radical approach to stem cell control is the establishment of direct synaptic contacts between differentiated and stem cells, as has evolved in the CB niche (see Figure 7I).

### ET-1 Released by Glomus Cells Activates CB Stem Cells and Organ Growth

Numerous agents released by O<sub>2</sub>-sensitive glomus cells could mediate the activation of quiescent CB NSCs to induce organ growth. In this study, we focused on ET-1 because it is a potent proliferative agent that participates in chronic hypoxia-induced vascular wall thickening, pulmonary hypertension, and right cardiac hypertrophy (Bonvallet et al., 1994; Eddahibi et al., 1995; Oparil et al., 1995). In addition, ET-1 is known to influence the biology of neural crest progenitors during development (Hosoda et al., 1994; Shin et al., 1999; Bonano et al., 2008). Systemic administration of ET-1 activates the CB, and both ET-1 and endothelin type A receptors have been demonstrated in glomus cells (McQueen et al., 1995; Paciga et al., 1999). ET-1 released from glomus cells has been postulated to exert a paracrine/auto-crine effect and to mediate CB plasticity under chronic hypoxia (Chen et al., 2002). Experiments using radiolabeled ET-1 (McQueen et al., 1995) and immunocytochemistry (Chen et al., 2002) have suggested the presence of ET-1 in glomus cells; however, the CB is rich in endothelial cells that highly express ET-1, and this could cause confounding results. Based on a combination of sorting of normal and transgenic cells with molecular biological and histological techniques, we provide unequivocal evidence that ET-1 is expressed in glomus cells *in vivo*



**Figure 7. ET-1 Increases CB NSC Proliferation In Vitro**

(A) Bright-field images of CB primary NSC showing the increase in their core diameter after 10 days of culture in the presence of ET-1. Differentiating blebs are pseudocolored in red. Scale bar, 100  $\mu$ m.

(B and C) Quantification of NS-forming efficiency and NS diameter from CB cultures ( $n = 4$ ) treated with ET-1.

(D) Quantification of nestin+ staining within NS sections from CB cultures ( $n = 3$ ) treated with ET-1.

(E) Dose-response effect of ET-1 on NS core diameter ( $n = 3$  cultures).

(F) Measurement of NS diameter from cultures ( $n = 3$ ) treated with the ET-1 receptor antagonist PD145065, which partially inhibits the effect of ET-1 (1  $\mu$ M).

(G) NS diameter after downregulation of endothelin receptor expression by siRNAs (50nM) in cultures treated with ( $n = 5$ ) or without ( $n = 4$ ) ET-1 (0.01  $\mu$ M).

(H) Increase in *c-myc* mRNA expression in NS treated with ET-1 (0.01  $\mu$ M) for 10 days ( $n = 5$  cultures).

(I) Schematic diagram illustrating the different “synaptic” communications taking place within a CB glomerulus exposed to hypoxia (bv, blood vessel; nf, sensory nerve fiber). 1, chemosensory synapse; 2, chemoproliferative synapse.

In (B–H), error bars represent SEM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ . See also Figures S4, S5, and S6 and Table S1.

and in vitro. We have also shown that endothelin A receptors are expressed not only in type I cells but also in type II cells, which were excluded in previous studies. More importantly, we have found that endothelin B receptors are abundantly expressed by CB stem cells. In agreement with these observations, it has been shown that endothelin B receptors are the predominant

form present in astrocytes (Koyama and Michinaga, 2012), which share the same GFAP+ cell lineage of NSCs in the brain, as well as in the CB (Pardal et al., 2007; Kriegstein and Álvarez-Buylla, 2009). ET-1 evoked proliferation of CB progenitors in vitro, and these effects were blunted by pharmacological or genetic downregulation of ET-1 receptors. As in other tissues (Wang et al.,

1994; Shichiri et al., 1998), ET-1 induced *c-myc*, a proproliferative and antiapoptotic immediate early gene, in CB progenitors. Taken together, these data strongly suggest that ET-1 is a powerful mediator of the glomus cell-stem cell “synapse” inducing CB stem cell activation in response to low PO<sub>2</sub>.

Studies of CB growth in chronic hypoxia have shown that, as well as indicating the differentiation of progenitor cells to newly generated glomus cells, some TH+ cells express proliferation markers (BrdU, PCNA, or Ki67) (Paciga et al., 1999; Chen et al., 2007; Pardal et al., 2007). These cells probably belong to a pool of prematured glomus cells, the abundance of which seems to vary among species. A detailed description of the proliferation of TH+ cells will be presented elsewhere. Nonetheless, the existence of close “synaptic-like” contacts between neighboring TH+ cells makes it possible that ET-1 released from glomus cells could also induce proliferation of immature TH+ cells (see Figure 7I).

### Essential Role of the O<sub>2</sub>-Sensitive Glomus Cell-Stem Cell Synapse in the Pathophysiology of Acclimatization to Hypoxia

The CB plays an important role in the reflex control of respiration in man. Individuals with bilateral CB ablation show permanent abolition of the ventilatory response to hypoxia (see Timmers et al., 2003). The CB is also essential for acclimatization to chronic hypoxia, a condition that affects millions of people who either live at or travel to high altitudes and thus are exposed to low atmospheric pressure. There are also highly prevalent human pathologic conditions, such as congestive heart failure or chronic obstructive pulmonary disease, that result in severe chronic hypoxemia due to a reduction in the O<sub>2</sub> exchange capacity between the air and the pulmonary capillaries. Survival under conditions of chronic hypoxia requires activation of the CB and the growth of the organ to enhance the respiratory drive necessary for sustained activation of the respiratory center (Powell et al., 1998; Joseph and Pequignot, 2009). Individuals who do not adapt well to chronic hypoxia develop neurological and cardiopulmonary dysfunctions and morbidities that can lead to death. The data presented here indicate that glomus cells are the central O<sub>2</sub>-sensitive “presynaptic” elements that mediate CB activation in acute (chemosensory synapses, 1 in Figure 7I) and chronic (chemoproliferative synapses, 2 in Figure 7I) hypoxia. Based on these findings, the development of a functional test that evaluates CB responsiveness to hypoxia could be of value to identify hypoxia-intolerant individuals. In addition, as the neurotransmitters, cell targets, and intracellular pathways are different in the two types of O<sub>2</sub>-sensitive synapses, the development of a selective pharmacological strategy could have potential therapeutic application.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

Transgenic mice (see Supplemental Information), WT mice, and Wistar rats were housed and treated according to the animal care guidelines of the European Community Council (86/609/EEC). All procedures were approved by the Animal Research Committee at the University of Seville.

### In Vivo Hypoxic Treatments and Drug Administration

Animals (rats and mice) were chronically exposed to a 10% or 14% O<sub>2</sub> environment using a hermetic isobaric chamber with O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> controls and temper-

ature and humidity monitoring (Coy Laboratory Products). To test CB growth in HIF-1 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> GFAP-cre mice, animals were exposed to hypoxia for 19 days and injected intraperitoneally with bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma, 50 mg/ml) at the beginning of the experiment and every 7 days. BrdU was also administered in drinking water (1 mg/ml) all the time. For the in vivo experiments with bosentan, rats (Charles River) were injected with BrdU at the beginning of the hypoxic period and divided into four groups: (1) normoxia, (2) normoxia plus bosentan, (3) chronic hypoxia, and (4) chronic hypoxia plus bosentan. Each group included the analysis of five CBs from four or five rats. Bosentan was fed to rats (100 mg/kg/day) through intragastric gavage once daily. Rats were housed in standard rodent cages with 24 hr access to pellet food and water. Bosentan treatment started 1 week before the hypoxic stimulus. Animals were maintained in the hypoxic environment for 7 days. Age-matched control rats were similarly housed in ambient air outside the chamber. Treatment with cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>, Sigma) was performed the same way as with bosentan, except that drug administration (intraperitoneally) started only 1 day before the hypoxic period at a dose of 1 mg/kg/day. Animals were distributed in four groups (six animals per group) and were treated with CdCl<sub>2</sub> under hypoxia for 2 days, after which the CBs were dissected and dissociated. Dimethylxylglycine (DMOG, Frontier Scientific) was administered twice daily at a dose of 80 mg/kg by intraperitoneal injection. Animals were distributed in three groups: (1) normoxia (four CBs from three animals), (2) chronic hypoxia (five CBs from three animals), and (3) DMOG (four CBs from three animals). DMOG was prepared in saline and stored at 4°C only for a maximum of 24 hr to avoid oxidation. Rats were treated for 3 or 14 days. After treatment, the hematocrit was measured in the 14 day group. The 3 day group of rats was used to perform qRT-PCR in the brain and CB immunocytochemistry. Their brains were removed and immediately immersed in Trizol (Ambion) for subsequent RNA extraction. Carotid bifurcations were dissected and postfixed in PFA for 6 hr. In every experiment involving drug administration, control groups included the injection of the vehicle used to reconstitute the drug.

### Histo- and Cytochemical Studies

For detection of TH, nestin, BrdU, Ki67, GFAP, CD31, and ET-1 receptors in tissue sections, neurospheres, and/or dispersed cells, we used standard staining procedures. Specific details are given in the Supplemental Information.

### Electron Microscopy and Quantification of Dense-Core Vesicles in Type I Cells

Control and TH-SDHD mice were intracardially perfused with PBS-based fixative containing 2% PFA plus 2.5% glutaraldehyde (EMS). Carotid bifurcations were dissected and kept in the same fixative for 2 hr. The bifurcations were then postfixed in 2% osmium for 1.5 hr, rinsed, dehydrated, and embedded in Durcupan resin (Fluka). Semithin sections (1.5  $\mu$ m) were cut with a diamond knife and stained with 1% toluidine blue for localization of glomeruli. Ultrathin sections (70 nm) were cut with a diamond knife, stained with lead citrate (Reynolds solution), and examined under a transmission electron microscope (FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin) using a digital camera (Morada, Soft Imaging System, Olympus). To estimate the percentage of dense-core vesicles distributed facing the different cellular elements, we analyzed four type I cells. We counted all the vesicles that appeared in an ultrathin section. For quantification of the density of dense-core vesicles in type I cells, distributed in front of the different cell types, we analyzed several profiles of type I cells in regions in which we could clearly identify the cell types confronted.

### Cell Dissociation and Neurosphere Assays

CB cell dissociation and neurosphere assays were performed as described in a previous paper from our laboratory (Pardal et al., 2007). Specific details are given in the Supplemental Information.

### RT-PCR and siRNA Assays

Total RNA was extracted from intact CBs, neurospheres, or dissociated cells using a commercial kit (RNeasy MICRO kit; QIAGEN). For the extraction, 8–10 CBs, or the equivalent amount of tissue from neurospheres, was used. Specific details of the procedures used for standard and real-time quantitative PCR are given in the Supplemental Information. The oligonucleotides used are



listed in Table S1. Dispersed CB cells were transfected after 8 hr in culture with siRNA smart pools against ET-RA, ET-RB, or siRNA control smart pool (50nM; Dharmacon) using lipofectamine2000 (Life Technologies-Invitrogen). Cells were allowed to form neurospheres during 7 days in the presence or absence of ET-1. This factor was added once at 64 hr after transfection. It had been tested before that a single ET-1 dose produced clear proliferative effects on CB neurospheres. Specific mRNA downregulation was analyzed 48 hr after transfection by qPCR. It was tested that inhibition of ET-receptor mRNA expression was maintained for at least 120 hr after transfection.

### Flow Cytometry

All sorts and analyses were performed as indicated before (Pardal et al., 2007). Cells dispersed from 4–6 CBs of TH-EGFP mice were sorted, and the resulting EGFP+ cells from several experiments were pooled to obtain enough RNA to perform PCR analysis. Details on animals stain and the procedures used are given in the Supplemental Information.

### Statistics

Data are given as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was estimated by paired or unpaired two sample t test. Paired t tests were used to analyze samples obtained from cell cultures and unpaired t tests were applied for the experiments involving animals. In the case of dense-core vesicle quantification, statistical significance was estimated by ANOVA and Bonferroni post hoc tests using SPSS software.

### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Extended Experimental Procedures, six figures, and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.013>.

### ACKNOWLEDGMENTS

Research was supported by the Botín Foundation (J.L.-B.), the European Research Council (Starting Grant; R.P.), and the Spanish Ministries of Science and Innovation and Health (SAF and TERCEL programs). A.P.-L. received a predoctoral fellowship of the FPU program. We are indebted to Patricia Ortega-Sáenz, Paula García-Flores, and Francisco M. Vega for help in the experiments. We thank María José Castro and Konstantin Levitsky for technical assistance and Martine Clozel (Actelion Pharmaceuticals) for the gift of bosentan.

Received: June 5, 2013

Revised: October 7, 2013

Accepted: November 11, 2013

Published: January 16, 2014

### REFERENCES

- Álvarez-Buylla, A., and Lim, D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683–686.
- Arias-Stella, J., and Valcarcel, J. (1976). Chief cell hyperplasia in the human carotid body at high altitudes; physiologic and pathologic significance. *Hum. Pathol.* 7, 361–373.
- Bishop, T., Talbot, N.P., Turner, P.J., Nicholls, L.G., Pascual, A., Hodson, E.J., Douglas, G., Fielding, J.W., Smith, T.G., Demetriades, M., et al. (2013). Carotid body hyperplasia and enhanced ventilatory responses to hypoxia in mice with heterozygous deficiency of PHD2. *J. Physiol.* 591, 3565–3577.
- Bonano, M., Tribulo, C., De Calisto, J., Marchant, L., Sánchez, S.S., Mayor, R., and Aybar, M.J. (2008). A new role for the Endothelin-1/Endothelin-A receptor signaling during early neural crest specification. *Dev. Biol.* 323, 114–129.
- Bonvallet, S.T., Zamora, M.R., Hasunuma, K., Sato, K., Hanasato, N., Anderson, D., Sato, K., and Stelzner, T.J. (1994). BQ123, an ETA-receptor antagonist, attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Physiol.* 266, H1327–H1331.
- Buttigieg, J., and Nurse, C.A. (2004). Detection of hypoxia-evoked ATP release from chemoreceptor cells of the rat carotid body. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 82–87.
- Chell, J.M., and Frisén, J. (2012). Noisy neurons keep neural stem cells quiet. *Cell Stem Cell* 11, 282–284.
- Chen, J., He, L., Dinger, B., Stensaas, L., and Fidone, S. (2002). Role of endothelin and endothelin A-type receptor in adaptation of the carotid body to chronic hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282, L1314–L1323.
- Chen, J., He, L., Liu, X., Dinger, B., Stensaas, L., and Fidone, S. (2007). Effect of the endothelin receptor antagonist bosentan on chronic hypoxia-induced morphological and physiological changes in rat carotid body. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L1257–L1262.
- Clouthier, D.E., Hosoda, K., Richardson, J.A., Williams, S.C., Yanagisawa, H., Kuwaki, T., Kumada, M., Hammer, R.E., and Yanagisawa, M. (1998). Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 125, 813–824.
- Czyzyk-Krzeska, M.F., Bayliss, D.A., Lawson, E.E., and Millhorn, D.E. (1992). Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. *J. Neurochem.* 58, 1538–1546.
- Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T.D., and Malenka, R.C. (2004). Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42, 535–552.
- Díaz-Castro, B., Pintado, C.O., García-Flores, P., López-Barneo, J., and Piruat, J.I. (2012). Differential impairment of catecholaminergic cell maturation and survival by genetic mitochondrial complex II dysfunction. *Mol. Cell. Biol.* 32, 3347–3357.
- Eddahibi, S., Raffestin, B., Clozel, M., Levame, M., and Adnot, S. (1995). Protection from pulmonary hypertension with an orally active endothelin receptor antagonist in hypoxic rats. *Am. J. Physiol.* 268, H828–H835.
- Elton, T.S., Oparil, S., Taylor, G.R., Hicks, P.H., Yang, R.H., Jin, H., and Chen, Y.F. (1992). Normobaric hypoxia stimulates endothelin-1 gene expression in the rat. *Am. J. Physiol.* 263, R1260–R1264.
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., and Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589–593.
- Heath, D., Smith, P., and Jago, R. (1982). Hyperplasia of the carotid body. *J. Pathol.* 138, 115–127.
- Höglinger, G.U., Rizk, P., Muriel, M.P., Duyckaerts, C., Oertel, W.H., Caille, I., and Hirsch, E.C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* 7, 726–735.
- Hosoda, K., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Baynash, A.G., Cheung, J.C., Giaid, A., and Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79, 1267–1276.
- Joseph, V., and Pequignot, J.M. (2009). Breathing at high altitude. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3565–3573.
- Kaelin, W.G., Jr., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 30, 393–402.
- Kokovay, E., and Temple, S. (2007). Taking neural crest stem cells to new heights. *Cell* 131, 234–236.
- Koyama, Y., and Michinaga, S. (2012). Regulations of astrocytic functions by endothelins: roles in the pathophysiological responses of damaged brains. *J. Pharmacol. Sci.* 118, 401–407.
- Kriegstein, A., and Álvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184.
- Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F., and Bordey, A. (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat. Neurosci.* 8, 1179–1187.
- López-Barneo, J., Pardal, R., and Ortega-Sáenz, P. (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 259–287.

- McQueen, D.S., Dashwood, M.R., Cobb, V.J., Bond, S.M., Marr, C.G., and Spyer, K.M. (1995). Endothelins and rat carotid body: autoradiographic and functional pharmacological studies. *J. Auton. Nerv. Syst.* 53, 115–125.
- Ming, G.L., and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702.
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150–161.
- Morrison, S.J., Csete, M., Groves, A.K., Melega, W., Wold, B., and Anderson, D.J. (2000). Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci.* 20, 7370–7376.
- Oparil, S., Chen, S.J., Meng, Q.C., Elton, T.S., Yano, M., and Chen, Y.F. (1995). Endothelin-A receptor antagonist prevents acute hypoxia-induced pulmonary hypertension in the rat. *Am. J. Physiol.* 268, L95–L100.
- Ortega-Sáenz, P., Pascual, A., Piruat, J.I., and López-Barneo, J. (2007). Mechanisms of acute oxygen sensing by the carotid body: lessons from genetically modified animals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 157, 140–147.
- Ortega-Sáenz, P., Levitsky, K.L., Marcos-Almaraz, M.T., Bonilla-Henao, V., Pascual, A., and López-Barneo, J. (2010). Carotid body chemosensory responses in mice deficient of TASK channels. *J. Gen. Physiol.* 135, 379–392.
- Paciga, M., Vollmer, C., and Nurse, C. (1999). Role of ET-1 in hypoxia-induced mitosis of cultured rat carotid body chemoreceptors. *Neuroreport* 10, 3739–3744.
- Panchision, D.M. (2009). The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J. Cell. Physiol.* 220, 562–568.
- Pardal, R., Ortega-Sáenz, P., Durán, R., and López-Barneo, J. (2007). Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 131, 364–377.
- Powell, F.L., Millsom, W.K., and Mitchell, G.S. (1998). Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir. Physiol.* 112, 123–134.
- Rubanyi, G.M., and Polokoff, M.A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 46, 325–415.
- Shichiri, M., Sedivy, J.M., Marumo, F., and Hirata, Y. (1998). Endothelin-1 is a potent survival factor for c-Myc-dependent apoptosis. *Mol. Endocrinol.* 12, 172–180.
- Shin, M.K., Levorse, J.M., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1999). The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* 402, 496–501.
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M.A., Sun, G.J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z.J., Ge, S., Enikolopov, G., et al. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489, 150–154.
- Stosic, J., Mirkov, I., Belij, S., Nikolic, M., Popov, A., Kataranovski, D., and Kataranovski, M. (2010). Gender differences in pulmonary inflammation following systemic cadmium administration in rats. *Biomed. Environ. Sci.* 23, 293–299.
- Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 9, 298–310.
- Timmers, H.J., Wieling, W., Karemaker, J.M., and Lenders, J.W. (2003). Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. *J. Physiol.* 553, 3–11.
- Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., and Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47, 803–815.
- Ureña, J., Fernández-Chacón, R., Benot, A.R., Álvarez de Toledo, G.A., and López-Barneo, J. (1994). Hypoxia induces voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10208–10211.
- Wang, Y., Rose, P.M., Webb, M.L., and Dunn, M.J. (1994). Endothelins stimulate mitogen-activated protein kinase cascade through either ETA or ETB. *Am. J. Physiol.* 267, C1130–C1135.
- Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645–660.